

Université de Sherbrooke

Analyse des déterminants de la suppression de l'anoïkose
chez les cellules carcinomateuses de côlon humain.

Par

Marie-Josée Demers
Anatomie et biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
En biologie cellulaire

15 mars 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 0-494-05898-6

Our file Notre référence

ISBN: 0-494-05898-6

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES FIGURES	viii
ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES	xiv
RÉSUMÉ	xvii

I – INTRODUCTION

1. APOPTOSE	1
1.1 Apoptose et généralités	1
1.2 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose	4
2. VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA SURVIE CELLULAIRE	5
2.1 La voie des MAP kinases : (MEK-1/2) / (p42 ^{Erk-2} /p44 ^{Erk-1})	5
2.2 La voie de la PI3-Kinase	8
2.2.1 p57 ^{Akt}	9
3. ADHÉSION CELLULAIRE ET SURVIE	12
3.1 Les intégrines	12
3.2 La kinase p125 ^{FAK}	13
4. SIGNALISATION IMPLIQUÉE DANS L'APOPTOSE/ANOÏKOSE	15
4.1 La kinase de stress p38 (SAPK)	15
5. ÉPITHÉLIUM INTESTINAL	17
5.1 Le modèle	17
5.2 Mécanismes de survie distincts selon l'état de différenciation entérocytaire	19

5.2.1 Les homologues Bcl-2 sont exprimés différenciellement au cours de la différenciation entérocytaire	20
5.2.2 FAK et l'adhésion cellulaire dans la survie cellulaire et l'apoptose/anoïkose selon l'état de différenciation entérocytaire	22
5.2.3 Implication différentielle de la voie MEK/Erk dans la survie cellulaire selon l'état de différenciation entérocytaire	23
5.2.4 Implication de la voie de signalisation PI3-K/Akt dans la survie cellulaire selon l'état de différenciation entérocytaire	23
5.2.5 Implication de la SAPK p38 dans la signalisation apoptose/anoïkose selon l'état de différenciation entérocytaire	24
6. MODÈLES <i>IN VITRO</i> DE DIFFÉRENCIATION ENTÉROCYTAIRE HUMAINE	25
7. LE CANCER	27
7.1 La signalisation de survie et le cancer	30
7.2 Le cancer du côlon	33
7.3 Modèles <i>in vitro</i> de cancer du côlon	37
8. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	39

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE	41
2. INCUBATION AVEC DIFFÉRENTS INHIBITEURS PHARMACOLOGIQUES	42
2.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés	43
3. MISE EN ÉVIDENCE DE L'APOPTOSE	44
3.1 Détection de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose	44

3.2 TUNEL <i>in situ</i>	46
3.3 Transfection des cellules T84 avec des constructions ADNc de p125 ^{FAK} (WT, p45 ^{FRNK} et Y397F)	48
4. ANALYSE IMMUNOPRÉCIPITATION/WESTERN BLOT	49
4.1 Solubilisation des protéines pour Western Blot	49
4.2 Solubilisation des protéines pour Immunoprécipitation	50
4.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)	51
4.4 Immunodétection des protéines (Western Blot)	51
4.5 Immunoprécipitation	52
4.6 Anticorps primaires utilisés	53
4.6.1 Anticorps détectant la protéine FAK	53
4.6.2 Anticorps détectant la protéine Akt-1	54
4.6.3 Anticorps détectant la protéine p44/42 MAP Kinase	54
4.6.4 Anticorps détectant la protéine p38	54
4.6.5 Anticorps détectant l'actine	55
4.7 Anticorps secondaires utilisés	56
4.8 Déshybridation des membranes	56
4.9 Analyses densitométriques et statistiques	56

III – RÉSULTATS

1. L'ANOÏKOSE ENTÉROCYTAIRE	58
1.1 L'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées	58

1.2 L'anoïkose chez différentes lignées de cancer colorectal	60
2. KINASE D'ADHÉSION FOCALISÉE (p125 ^{FAK}) ET SURVIE CELLULAIRE	62
2.1 Niveaux d'expression et d'activation de base de FAK chez différentes lignées de cancer colorectal	62
2.2 Impact de l'inhibition de la kinase FAK sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal	64
2.3 Impact de l'introduction de constructions mutantes de p125 ^{FAK} (p45 ^{FRNK} et Y397F) sur la survie des cellules cancéreuses de côlon T84	73
2.4 Effet de l'anoïkose sur les niveaux d'activation de p125 ^{FAK}	76
2.5 Effet de l'inhibition de FAK sur les niveaux d'activation de la kinase chez différentes lignées de cancer colorectal	77
3. LA VOIE PI3-K/AKT-1 ET LA SURVIE CELLULAIRE	80
3.1 Niveaux d'expression et d'activation de base d'Akt-1 chez différentes lignées de cancer colorectal	80
3.2 Impact de l'inhibition de la PI3-K sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal	82
3.3 Effet de l'inhibition de la PI3-K sur les niveaux d'activation de FAK chez différentes lignées de cancer colorectal	91
3.4 Effet de l'inhibition de la PI3-K sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal	93
3.5 Effet de l'inhibition de la PI3-K sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez différentes lignées de cancer colorectal	95
3.6 Effet de l'anoïkose sur les niveaux d'activation d'Akt-1	95
3.7 Effet de l'inhibition de FAK sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez différentes lignées de cancer colorectal	97

4. LA VOIE MEK/ERK ET LA SURVIE CELLULAIRE	100
4.1 Niveaux d'expression et d'activation de base de Erk-1/Erk-2 chez différentes lignées de cancer colorectal	100
4.2 Impact de l'inhibition de MEK sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal	102
4.3 Effet de l'inhibition de MEK sur les niveaux d'activation de FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal	111
4.4 Effet de l'inhibition de MEK sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal	113
4.5 Effet de l'inhibition de MEK sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal	113
4.6 Effet de l'inhibition de FAK sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez différentes lignées de cancer colorectal	115
5. LA KINASE DE STRESS p38 ET LA SURVIE CELLULAIRE	118
5.1 Niveaux d'expression et d'activation de base de p38 chez différentes lignées de cancer colorectal	118
5.2 Impact de l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal	120
5.3 Effet de l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) sur les niveaux d'activation de p38 chez différentes lignées de cancer colorectal	129
IV – DISCUSSION	131
1. LES SUSCEPTIBILITÉS DISTINCTES À L'ANOÏKOSE DES CELLULES CANCÉREUSES DE COLON	133
2. IMPLICATION DIFFÉRENTIELLE DE LA KINASE FAK DANS LA SURVIE DES CELLULES CANCÉREUSES DE COLON	134
3. IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION PI3-K/AKT-1 DANS LA SURVIE DES CELLULES CANCÉREUSES DE COLON	137

4. IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION MEK/ERK DANS LA SURVIE DES CELLULES CANCÉREUSES DE COLON	142
5. IMPLICATION DE LA KINASE DE STRESS P38 (α/β) DANS LA SURVIE DES CELLULES CANCÉREUSES DE COLON	146
V – CONCLUSIONS	150
REMERCIEMENTS	152
BIBLIOGRAPHIE	153

LISTE DES FIGURES

I - INTRODUCTION

Figure 1	Représentation schématique de l'apoptose.	3
Figure 2	Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire.	6
Figure 3	Compartimentalisation spatiale cellulaire et localisation de l'apoptose le long de l'axe crypte-villosité de l'épithélium intestinal humain.	18
Figure 4	Régulation différentielle de la survie cellulaire et de l'apoptose/anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation entérocytaire.	21
Figure 5	Modèles <i>in vitro</i> de différenciation entérocytaire.	26
Figure 6	Capacités acquises chez une cellule cancéreuse.	29

III – RÉSULTATS

Figure 7	Susceptibilités différentielles à l'anoïkose des cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.	59
Figure 8	Susceptibilités distinctes à l'anoïkose des cellules cancéreuses de côlon HCT116, HT29 et T84.	61
Figure 9	Les niveaux d'expression et d'activation de base de FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal ne correspondent pas à leur degré de dédifférenciation.	63

Figure 10	Les cellules HIEC sont sensibles à l'inhibition de la kinase FAK.	65
Figure 11	Les cellules Caco-2PC sont sensibles à l'inhibition de la kinase FAK.	66
Figure 12	Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de la kinase FAK. ...	67
Figure 13	Les cellules HCT116 entrent en anoïkose suite à l'inhibition de la kinase FAK.	68
Figure 14	Les cellules HT29 entrent en anoïkose suite à l'inhibition de la kinase FAK.	69
Figure 15	Les cellules T84 entrent en anoïkose suite à l'inhibition de la kinase FAK.	70
Figure 16	L'inhibition de la kinase FAK induit l'anoïkose chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84.	71
Figure 17	La survie des cellules T84 n'est pas affectée par l'introduction de constructions mutantes de la protéine p125 ^{FAK} (p45 ^{FRNK} et FAKY397F).	74
Figure 18	L'introduction de constructions mutantes de p125 ^{FAK} , soient p45 ^{FRNK} et FAKY397F, n'induit pas l'anoïkose chez les cellules T84.	75
Figure 19	La perte d'adhésion cellulaire induit une forte baisse des niveaux d'activation de la kinase p125 ^{FAK} chez les différentes lignées de cancer colorectal.	78

Figure 20	L'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D induit une baisse significative des niveaux d'activation de la kinase chez les différentes lignées de cancer colorectal..	79
Figure 21	Les niveaux d'activation de base d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal correspondent à leur degré de dédifférenciation.	81
Figure 22	Les cellules HIEC sont sensibles à l'inhibition de la PI3-K.	83
Figure 23	Les cellules Caco-2PC sont sensibles à l'inhibition de la PI3-K.	84
Figure 24	Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de la PI3-K.....	85
Figure 25	Les cellules HCT116 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de la PI3-K.	86
Figure 26	Les cellules HT29 entrent en apoptose suite à l'inhibition de la PI3-K.....	87
Figure 27	Les cellules T84 entrent en apoptose suite à l'inhibition de la PI3-K.	88
Figure 28	L'inhibition de la PI3-K induit l'apoptose chez les cellules HT29 et T84, mais non chez les cellules HCT116.	89
Figure 29	L'inhibition de la PI3-K ne provoque aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal.	92
Figure 30	L'inhibition de la PI3-K n'induit aucune modulation des niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HT29 et T84, alors qu'elle provoque une hausse chez les cellules HCT116.....	94

Figure 31	L'inhibition de la PI3-K induit une baisse significative des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal.	96
Figure 32	La perte d'adhésion cellulaire induit une forte baisse des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84.	98
Figure 33	L'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D induit une forte baisse des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84.	99
Figure 34	Les niveaux d'activation de base de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal correspondent à leur degré de dédifférenciation.	101
Figure 35	Les cellules HIEC sont insensibles à l'inhibition de MEK.	103
Figure 36	Les cellules Caco-2PC sont insensibles à l'inhibition de MEK.	104
Figure 37	Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de MEK.	105
Figure 38	Les cellules HCT116 entrent en apoptose suite à l'inhibition de MEK. .	106
Figure 39	Les cellules HT29 entrent en apoptose suite à l'inhibition de MEK.	107
Figure 40	Les cellules T84 entrent en apoptose suite à l'inhibition de MEK.	108
Figure 41	L'inhibition de MEK induit l'apoptose chez les cellules HCT116, HT29 et T84.	109

Figure 42	L'inhibition de MEK ne provoque aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal.	112
Figure 43	L'inhibition de MEK n'induit aucune modulation des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules HCT116, HT29 et T84.....	114
Figure 44	L'inhibition de MEK induit une baisse significative des niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal.	116
Figure 45	L'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D induit une baisse significative des niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal.	117
Figure 46	Les niveaux d'activation de base de p38 chez les différentes lignées de cancer colorectal correspondent à leur degré de dédifférenciation.	119
Figure 47	Les cellules HIEC sont insensibles à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β).	121
Figure 48	Les cellules Caco-2PC sont insensibles à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β).	122
Figure 49	Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β).	123
Figure 50	Les cellules HCT116 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β).	124

Figure 51	Les cellules HT29 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β).	125
Figure 52	Les cellules T84 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β).	126
Figure 53	L'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) n'induit pas l'apoptose chez les cellules HCT116, HT29 et T84.	127
Figure 54	L'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) n'induit aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase p38 chez les différentes lignées de cancer colorectal.	130

ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

Note : Comme dans la littérature en général, les acronymes anglophones sont utilisés pour éviter la confusion. Dans la liste des abréviations, le nom est d'abord donné en français puis en anglais (entre parenthèses) dans le but de montrer la provenance de l'acronyme.

ATP	Adénosine triphosphate
BSA	Albumine de sérum bovin (Bovine Serum Albumin)
CD	Cytochalasine D
CREB	cAMP response element binding protein
Ctrl	Contrôle
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco modified Eagle's medium)
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTT	Dithiothreitol
dUTP	Désoxyuridine triphosphate
ECL	Enhance chemiluminescence
EDTA	Ethylène diamine tétra acide acétique
EGF	Facteur de croissance épidermique (epidermal growth factor)
ERK	Kinases régulées par des facteurs extracellulaires (extracellular-regulated kinase)
FAK	Kinase d'adhésion focalisée (focal adhesion kinase)
FKHR	Forkhead transcription factor
Ig	Immunoglobulines
LY	LY294002

MAPK	Protéine kinase activée par des mitogènes (mitogen-activated protein kinase)
MEK	MAPK/ERK kinase
MEKK-1	MAP kinase/ERK kinase kinase-1
min.	Minutes
MKK	MAP kinase kinase
ml	Millilitre
Na	Sodium
NaCl	Chlorure de sodium
nm	Nanomètre
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (polyacrylamide gel electrophoresis)
PBS	Tampon phosphate salin (Phosphate buffer saline)
PC	Post-confluence
PD	PD98059
PI3-K	Phosphatidylinositol 3'-OH Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
p-NPP	para-Nitrophényl phosphate
PolyHEMA	Poly (2-Hydroxyethyl methacrylate)
Rpm	Révolution par minute
SB	SB202190
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Erreur standard sur la moyenne (standard error on mean)
SS	Sans sérum

Std.	Standard de poids moléculaire d'ADN
TdT	Terminal désoxynucléotidyl transférase
TE	Tris-EDTA
TGF	Facteur de croissance transformant (transforming growth factor)
TKs	Tyrosines Kinases
TNF	Tumor necrosis factor
T°P	Température pièce
TUNEL	Marquage des cassures d'ADN par le dUTP médié par la TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP mediated nick end labelling)
UV	Rayon ultraviolet
µg	Microgramme
µl	Microlitre
V	Volt
WT	Type sauvage (Wild type)

Analyse des déterminants de la suppression de l'anoïkose chez les cellules carcinomateuses de côlon humain.

Marie-Josée Demers

Groupe IRSC Développement fonctionnel et Physiopathologie du tractus digestif,
Département d'Anatomie et de Biologie Cellulaire, Université de Sherbrooke

En vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

Le cancer colorectal est la deuxième cause majeure de mort par le cancer en Amérique du Nord. Le cancer en général est une maladie impliquée dans des changements dynamiques dans le génome. Plusieurs évidences indiquent que la tumorigénécité est un processus en plusieurs étapes qui reflète les altérations génétiques conduisant la transformation progressive des cellules normales en cellules malignes. Lors des étapes de la progression cancéreuse, les cellules vont non seulement subir un processus de dédifférenciation, mais elles vont aussi acquérir des avantages de prolifération et de survie, incluant le développement d'une résistance à l'anoïkose. Les bases moléculaires de cette dérégulation de l'apoptose/anoïkose dans un contexte de cancérogenèse demeurent incomprises.

Étant donné que : 1) les cellules cancéreuses peuvent acquérir des mutations au cours de la cancérogenèse qui leur confère une certaine résistance à l'apoptose/anoïkose ; 2) les bases moléculaires de cette dérégulation de l'apoptose/anoïkose dans un contexte de cancérogenèse demeurent incomprises ; et 3) la survie et l'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales sont sujettes à des mécanismes distincts de régulation selon l'état de différenciation entérocytaire ; l'hypothèse de travail de mon projet de recherche était que *les cellules cancéreuses de côlon exhibent des attributs moléculaires de suppression de l'anoïkose qui s'apparentent plus aux cellules épithéliales intestinales indifférenciées que différenciées*. Les objectifs spécifiques de recherche étaient les suivants : 1) déterminer les susceptibilités à l'anoïkose par des cinétiques de dégradation de l'ADN internucléosomal ; 2) déterminer les niveaux d'activation de kinases impliquées dans la survie entérocytaire (FAK, la voie PI3-K/Akt-1, Erk-1/Erk-2 et p38) ; et 3) déterminer l'impact de l'inhibition des différentes kinases sur la survie cellulaire et sur les niveaux d'activation des kinases ciblées. Pour ce faire, 4 groupes de lignées cellulaires ont été utilisées : HCT116 et HT29, 2 lignées qui sont incapables de différenciation (ou polarisation) entérocytaire et qui croissent de façon anarchique ; T84, qui cessent de croître à l'atteinte de la confluence pour former une monocouche de cellules polarisées, mais non pleinement différenciées ; Caco-2/15, capables de pleine différenciation entérocytaire et HIEC-6, des cellules normales de la crypte intestinale, également utilisées afin de vérifier la validité du modèle Caco-2/15 -2PC (cellules épithéliales intestinales indifférenciées).

Dans un premier temps, nous avons montré que les cellules cancéreuses de côlon exhibent des susceptibilités à l'anoïkose distinctes de celles des cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées. De façon générale, il semble y avoir un lien entre le degré de dédifférenciation des cellules cancéreuses de côlon testées et leur susceptibilité à l'anoïkose.

Dans un deuxième temps, nous avons montré que les niveaux d'activation de base de FAK ne correspondent pas nécessairement au degré de dédifférenciation des différentes lignées cancéreuses analysées ici. Cependant, les niveaux d'activation de base d'Akt-1, Erk-1/Erk-2 et p38 correspondent au degré de dédifférenciation des différentes lignées cancéreuses analysées ici.

Dans un troisième temps, nous avons vérifié l'impact de l'inhibition de différentes kinases sur les niveaux d'activation des kinases ciblées. Nous avons montré que : 1) les niveaux relatifs d'activation de p125^{FAK} et d'Akt-1 diminuent significativement suite à la perte d'adhésion cellulaire ; 2) les niveaux relatifs d'activation de p125^{FAK}, Akt-1 et Erk-1/Erk-2 diminuent significativement suite à l'inhibition spécifique de la kinase FAK ; 3) les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 diminuent significativement suite à l'inhibition de la PI3-K ; et 4) les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 diminuent significativement suite à l'inhibition de MEK. Ces modulations des présentes kinases ressemblent donc à celles des cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées, et suggèrent qu'elles sont sujettes à des modes normaux de régulation.

Finalement, nous avons montré que : 1) la survie des cellules HCT116 est dépendante de FAK et de la voie MEK/Erk, mais est indépendante de la PI3-K ; 2) la survie des cellules HT29 est dépendante de FAK, de la voie MEK/Erk et de la PI3-K ; 3) la survie des cellules T84 est dépendante de la voie MEK/Erk et de la PI3-K, mais est indépendante de FAK ; et 4) la survie des cellules cancéreuses de côlon analysées ici est indépendante de l'activité catalytique de p38 (α/β). Nous ne pouvons donc pas associer les propriétés de survie des cellules cancéreuses de côlon exclusivement à celles des cellules épithéliales intestinales indifférenciées.

En résumé, notre étude nous a permis de confirmer que la survie des cellules cancéreuses de côlon est gouvernée par des mécanismes qui peuvent s'avérer être distincts de ceux impliqués dans la survie des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, que ce soit au niveau de leur susceptibilité à l'anoïkose ou de l'implication spécifique de molécules et/ou de voies de signalisation dans la survie des cellules épithéliales intestinales. Nous ne pouvons donc pas d'une manière générale associer les cellules cancéreuses de côlon aux cellules épithéliales intestinales indifférenciées, ce qui suggère une complexité accrue dans l'acquisition d'avantages de résistance à l'apoptose/anoïkose par les cellules cancéreuses au cours de la progression tumorale.

I – INTRODUCTION

1. *Apoptose*

1.1 *Apoptose et généralités*

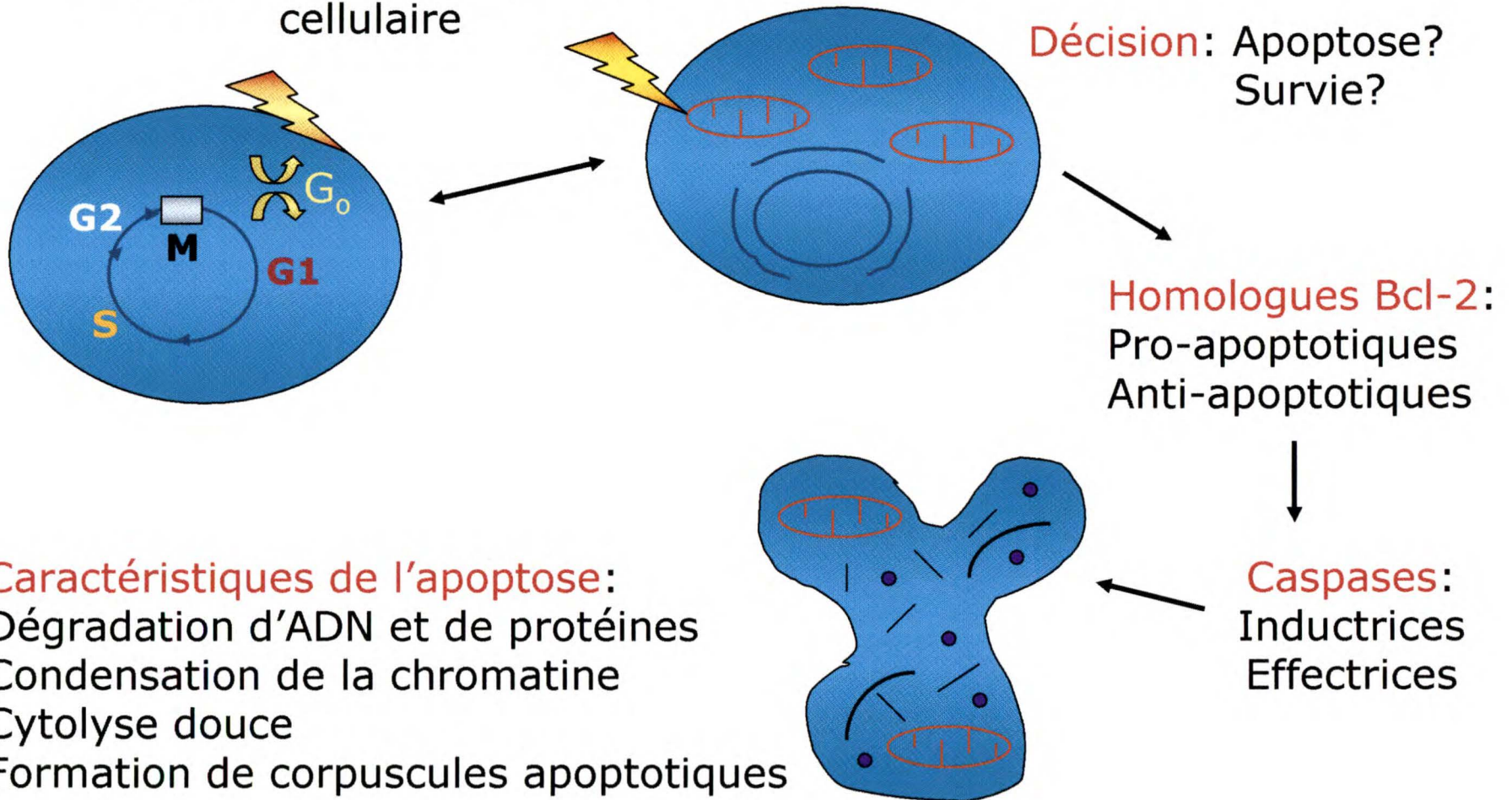
La mort cellulaire est un processus essentiel qui peut se manifester par deux mécanismes différents : la nécrose ou l'apoptose. La nécrose est une réaction physiologique cellulaire en réponse à certains stimuli qui vont provoquer des dommages majeurs à la cellule (Nicotera et Melino, 2004). La réaction engendrée est une lyse explosive de la cellule où le contenu cytoplasmique intact est relâché dans le microenvironnement (Guimarães et Linden, 2004). Ce dernier devient toxique pour les cellules avoisinantes, et il y aura formation d'une zone nécrotique (Ziegler et Groscurth, 2004). La nécrose est un phénomène indiscriminatoire et non régulé, et la conséquence majeure résultante est l'activation d'une réponse inflammatoire afin d'éliminer les cellules endommagées ou les tissus affectés (Nelson et White, 2004).

L'apoptose ou la mort cellulaire programmée est un processus complexe hautement régulé et ciblé qui ne provoque pas de réaction inflammatoire, au contraire de la nécrose (Nelson et White, 2004). Elle exerce des fonctions cruciales dans le développement, dans l'homéostasie des tissus, la réparation tissulaire ainsi que dans la pathogenèse de plusieurs maladies (Jacobson et al., 1997 ; Vaux et Korsmeyer, 1999 ; Cory et Adams, 2002 ; Nelson et White, 2004). L'apoptose est régie par un programme génétiquement conservé autant chez les invertébrés que chez les vertébrés (Ellis et al., 1991). L'apoptose est intrinsèque à chaque cellule et peut être induite suite à certains

stimuli, tels les agents génotoxiques (oxydants, radiations) qui provoquent des dommages à l'ADN, les toxines, le stress, la perte de facteurs de croissance, les infections virales ainsi que les chocs thermiques ou osmotiques (figure 1) (Saini et Walker, 1998 ; Ziegler et Groscurth, 2004). D'un autre côté, la survie cellulaire n'est pas un processus passif puisque la cellule a constamment besoin de signaux de survie afin d'empêcher celle-ci d'entrer en apoptose. Le maintien de la survie cellulaire requiert une constante régulation par des stimuli variés qui peuvent provenir de facteurs de croissance, de cytokines, d'hormones et de l'adhésion cellulaire (spécifiquement les interactions cellule-matrice) (figure 1) (Ruoslahti et Reed, 1994 ; Frisch et Ruoslahti, 1997 ; Frisch et Screaton, 2001). Des signaux complexes provenant de l'environnement (extérieur et/ou intérieur) de la cellule sont émis afin de promouvoir la mort cellulaire ou la survie. L'intégration de ces signaux se fait principalement via une famille de protéines appelées homologues Bcl-2, qui peuvent être des molécules pro- ou anti-apoptotiques, et qui jouent un rôle central dans la détermination du devenir de la cellule (figure 1). Il est également bien connu que l'induction ou la suppression de l'apoptose ne dépend pas de l'activité d'un seul homologue Bcl-2, mais plutôt d'une balance des activités de plusieurs homologues Bcl-2 pro- et anti-apoptotiques (Reed et al., 1996 ; Adams et Cory, 1998). Le stage final de l'apoptose est l'activation des caspases (inductrices et effectrices), une famille de cystéines protéases hautement conservées. Leur activité protéolytique est responsable du processus de dégradation que nous observons au cours de l'apoptose (figure 1). Une fois les caspases activées, le processus apoptotique est irréversible (Reed et al., 1996 ; Adams et Cory, 1998 ; Green, 1998). La dérégulation de l'apoptose peut contribuer au cancer, aux maladies auto-immunes, à l'immunodéficience, à l'infertilité et

Figure 1. Représentation schématique de l'apoptose. L'apoptose ou la mort cellulaire programmée peut être causée par bien des facteurs comme par exemple, des agents toxiques, des cytokines, du stress, des dommages à l'ADN, une perte de facteurs de croissance et la perte d'adhésion cellulaire (spécifiquement les interactions cellule-matrice) (anoïkose). Suite à ces stimuli, la cellule subit des dommages et doit prendre une décision; soit entrer en apoptose ou survivre. Si la décision de la cellule est d'entrer en apoptose, la balance favorisera les homologues pro-apoptotiques versus les anti-apoptotiques. Les caspases inductrices seront activées suivies des caspases effectrices qui provoqueront la dégradation de l'ADN et des protéines, la condensation de la chromatine, une cytolyse douce et la formation de corpuscules apoptotiques, qui sont tous des événements caractéristiques de l'apoptose.

Agents toxiques, cytokines,
stress, dommages à l'ADN,
perte de facteurs de
croissance, perte d'adhésion
cellulaire



à des désordres dégénératifs (Thompson, 1995 ; Reed et al., 1996 ; White, 1996 ; Guimarães et Linden, 2004 ; Nelson et White, 2004 ; Nicotera et Melino, 2004).

1.2 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose

Au niveau morphologique, l'apoptose se caractérise par plusieurs événements (figure 1). Les premiers signes sont une condensation du matériel nucléaire, soit la chromatine. Ceci est accompagné par un rétrécissement cellulaire, donc la déshydratation du cytoplasme et la fragmentation des organelles. Une vacuolisation membranaire (plasmique et nucléaire) a également lieu ainsi qu'une dégradation internucléosomique de l'ADN (fragmentation de l'ADN entre les nucléosomes qui génère des multiples de ~180 paires de bases, formant une échelle lorsque visualisée sur gel d'agarose). La membrane nucléaire se dégrade alors formant des fragments discrets dans le cytoplasme. Le processus apoptotique se termine par une protéolyse totale et une cytolyse non inflammatoire. Éventuellement, les cellules elles-mêmes se fragmentent formant un certain nombre de corpuscules apoptotiques qui renferment le contenu cellulaire réduit à sa plus simple expression. Ces derniers sont généralement phagocytés par les macrophages et/ou les cellules avoisinantes, ou éliminés par exfoliation dans une lumière (Kroemer et al., 1995 ; Allen et al., 1997 ; Hall, 1999).

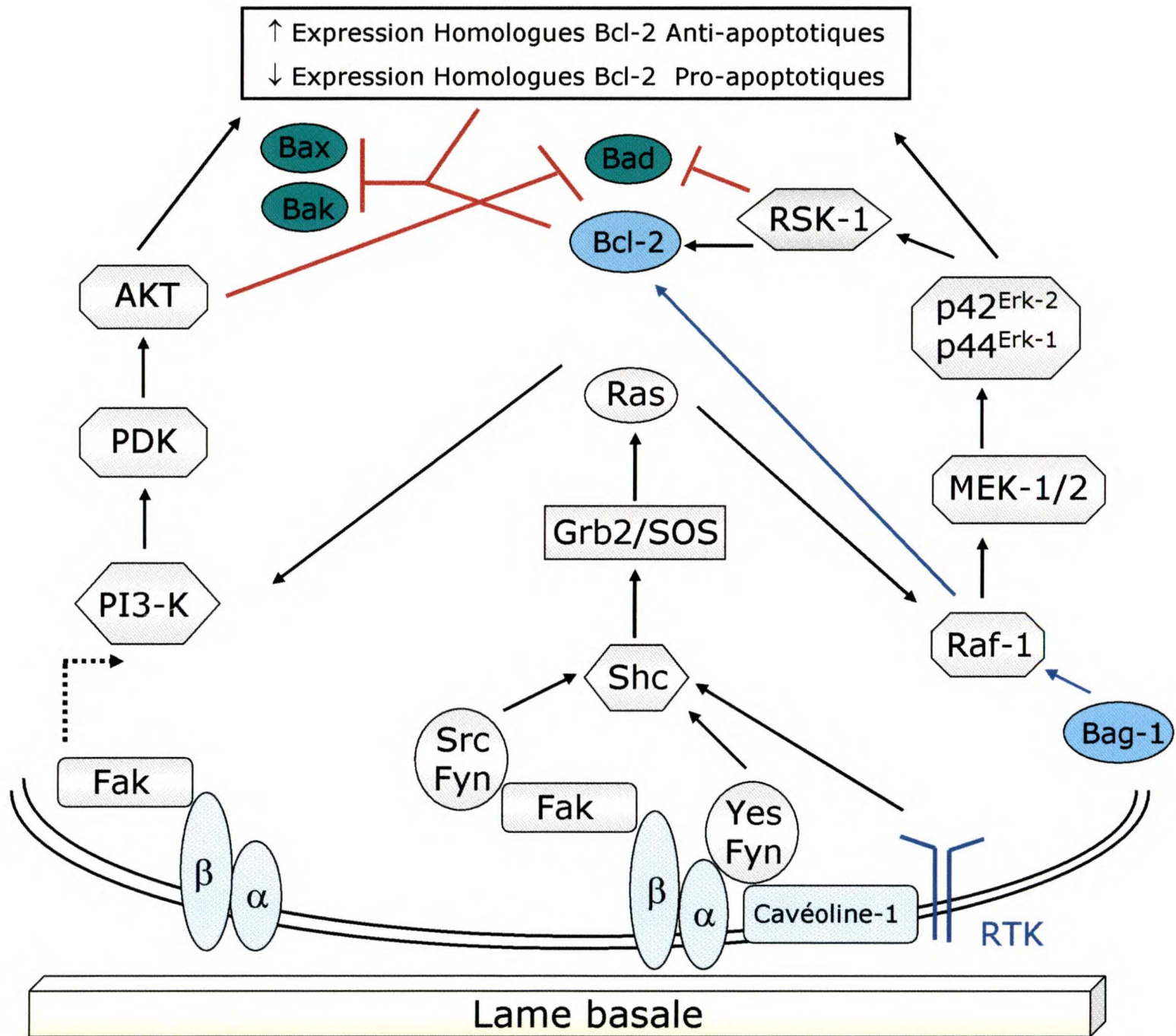
2. Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire

Les signaux extracellulaires ont une grande importance dans la détermination de la survie cellulaire. Ces signaux de survie peuvent provenir des hormones (ex : l'insuline) et/ou des facteurs de croissance (ex : EGF) et/ou de l'adhésion cellulaire et peuvent impliquer des voies de signalisation communes (Anderson, 1997 ; Frisch et Ruoslahti, 1997 ; Giancotti, 1997 ; Datta et al., 1999 ; Cross et al., 2000). Parmi les voies de signalisation connues impliquées dans la survie, la voie des MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») ($p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$) et la voie de la PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt (PKB) ont reçu une attention particulière ces dernières années (figure 2) (Anderson, 1997 ; Giancotti, 1997 ; Datta et al., 1999 ; Coppolino et Dedhar, 2000 ; Cross et al., 2000 ; Le Gall et al., 2003). Cependant, il devient évident que l'implication de ces voies/molécules de signalisation dans la survie cellulaire varie selon le type cellulaire et selon les stimuli reçus, augmentant ainsi la complexité et la spécificité de la régulation de l'apoptose parmi différents tissus (Anderson, 1997 ; Jacobson et al., 1997 ; Datta et al., 1999 ; Coppolino et Dedhar, 2000 ; Cross et al., 2000 ; Cory et Adams, 2002).

2.1 La voie des MAP kinases : ($MEK-1/2$)/($p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}$)

La voie des MAP kinases peut être activée par divers stimuli tels les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones et les interactions cellule-matrice (Kyriakis et Avruch, 2001 ; Chang et al., 2003). La voie des MAP kinases ainsi activée permet alors

Figure 2. Voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire. Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et les intégrines médient les voies de signalisation de survie communes : la voie des MAPK (« mitogen-activated protein kinase ») et la voie PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt (PKB). Au niveau de la survie médiée par l'adhésion cellulaire (intégrines, cavéoline-1), FAK (« focal adhesion kinase ») et les tyrosines kinases membres de la famille Src (Src, Fyn et Yes) sont responsables de la transmission de signal et de l'activation des voies de signalisation en aval. Les RTK activent ces voies de survie via la protéine adaptatrice Shc. Le signal passe ensuite par l'échangeur Grb2/SOS et par l'activation de l'oncogène Ras. Les voies de signalisation activées (PI3-K/Akt et MAP kinases) sont directement impliquées dans le contrôle de la survie. Finalement, Akt ainsi que Erk-1/Erk-2 vont transloquer au noyau de la cellule et moduler à la hausse l'expression des homologues Bcl-2 anti-apoptotiques et moduler à la baisse l'expression des homologues Bcl-2 pro-apoptotiques. L'activation de la voie MEK/Erk résulte en la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad par la kinase RSK-1; Akt/PKB peut également phosphoryler Bad, provoquant son inactivation. Bcl-2 lui-même va se faire phosphoryler par Erk-1/Erk-2, le protégeant contre l'ubiquitination et permettant son accumulation dans le cytoplasme. La protéine anti-apoptotique BAG-1 peut interagir avec Raf-1, et cette dernière pourra phosphoryler Bcl-2, augmentant ainsi ses fonctions anti-apoptotiques.



la coordination de l'activation de gènes de transcription, de synthèse protéique, de machinerie du cycle cellulaire, de différenciation cellulaire et de mort cellulaire programmée (apoptose). Tous ces événements dépendent évidemment de la nature des stimuli ainsi que du type cellulaire impliqué. Plusieurs études ont démontré que l'activation de $p42^{\text{Erk-2}}/p44^{\text{Erk-1}}$ permet une inhibition de l'apoptose par cette voie. Les stimuli pro-apoptotiques tels l'activation du récepteur Fas (Holmstrom et al., 1998 ; Yeh et al., 1998 ; Stupack et Cheresch, 2002), l'absence de sérum (Renshaw et al., 1997 ; Le Gall et al., 2000 ; Kyriakis et Avruch, 2001) et la perte d'adhésion cellulaire (anoïkose) (Le Gall et al., 2000 ; Frisch et Screaton, 2001 ; Kyriakis et Avruch, 2001 ; Stupack et Cheresch, 2002) peuvent être contrés par l'activité de Erk-1/Erk-2.

Par contre, les substrats de $p42^{\text{Erk-2}}/p44^{\text{Erk-1}}$ impliqués dans la survie cellulaire sont plus ou moins bien connus jusqu'à aujourd'hui. L'activation de la voie MEK/Erk (figure 2) résulte en la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad (sur la sérine 112), et cela provoque son inactivation (séquestration) par une protéine chaperonne 14-3-3 (Von Gise et al., 2001 ; Stupack et Cheresch, 2002 ; Chang et al., 2003). De plus, la kinase $p90^{\text{RSK}}$, située en aval de $p42^{\text{Erk-2}}/p44^{\text{Erk-1}}$, peut également phosphoryler l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bad (sur les sérine 112 et sérine 155) (Tan et al., 1999 ; Tan et al., 2000). La phosphorylation sur la sérine 155 de Bad empêche son hétérodimérisation avec l'homologue Bcl-2 anti-apoptotique Bcl-X_L favorisant ainsi la survie cellulaire (Datta et al., 2000 ; Lizcano et al., 2000 ; Tan et al., 2000 ; Zhou et al., 2000). La phosphorylation de Bcl-2 lui-même par Erk-1/Erk-2 (Thr56, Thr74, Ser84) le protège contre l'ubiquitination, donc éventuellement la protéolyse, permettant ainsi son

accumulation dans le cytoplasme et la promotion de la survie cellulaire (Breitschopf et al., 2000 ; Stupack et Cheresch, 2002). Raf-1, qui est connue pour être un activateur de Erk-1/Erk-2, peut avoir un rôle propre dans la suppression de l'apoptose. En effet, la protéine anti-apoptotique BAG-1 va interagir avec Raf-1 et cette dernière pourra phosphoryler Bcl-2 lui-même, augmentant ainsi ses fonctions anti-apoptotiques (Frisch et Screaton, 2001 ; Townsend et al., 2003). Bim est un homologue Bcl-2 pro-apoptotique qui est normalement séquestré dans le cytosquelette de la cellule par sa liaison aux chaînes légères de dynéine qui sont associées aux microtubules (Cory et Adams, 2002). Récemment, un autre mécanisme de contrôle de Bim a été proposé; Erk-1/Erk-2 serait responsable de la phosphorylation de Bim sur la sérine 69, permettant alors sa dégradation via la voie du protéasome et régulant ainsi sa fonction pro-apoptotique (Luciano et al., 2003 ; Marani et al., 2004).

2.2 La voie de la PI3-Kinase

Des données récentes ont impliqué la PI3-Kinase, qui est un hétérodimère composé d'une sous-unité régulatrice (p85) et d'une sous-unité catalytique (p110), dans la promotion de la survie cellulaire suite à des stimuli extracellulaires. Ces derniers peuvent être médiés par des récepteurs transmembranaires possédant une activité tyrosine kinase intrinsèque (ex : le récepteur à l'EGF) (Segal et Greenberg, 1996) et via les intégrines (suite à la liaison de leur ligand) (Clark et Brugge, 1995). L'activation de ces récepteurs résulte en le recrutement de la PI3-Kinase au niveau de la membrane plasmique interne de la cellule. Une fois localisée à la membrane, la PI3-Kinase va

catalyser le transfert d'un phosphate de l'ATP sur la position D-3 de l'anneau inositol des phosphoinositides, générant ainsi ses seconds messagers (PI3,4P et PI3,4,5P) qui serviront de signal intermédiaire dans la régulation des voies de signalisation en aval (Jimenez et al., 1998 ; Datta et al., 1999 ; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000).

Initialement, il a été démontré que l'activité de la PI3-Kinase était requise pour la survie des cellules neuronales en absence de sérum (Yao et Cooper, 1995). Subséquemment, l'activité de la PI3-Kinase a été démontrée requise pour la survie d'une grande variété de types cellulaires (Datta et al., 1999 ; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000 ; Downward, 2004). Il a également été prouvé que la transfection de cellules avec une forme constitutive active de la PI3-Kinase rend celles-ci résistantes à l'apoptose, et ce, même en absence de sérum (Datta et al., 1999 ; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). De plus, une forme mutante de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-Kinase, soit la p65, a été isolée de cellules transformées (lymphomes). Il a été démontré que cette mutation (p65) induisait l'activation constitutive de la PI3-Kinase et contribuait à l'acquisition d'un phénotype cellulaire transformé (cancer et résistance à l'apoptose) (Jimenez et al., 1998).

2.2.1 *p57^{Akt}*

La sérine/thréonine kinase Akt/PKB (protéine kinase B) a été identifiée comme étant un effecteur majeur de l'activité de la PI3-Kinase dans la promotion et le maintien de la survie cellulaire (Coffer et al., 1998 ; Datta et al., 1999 ; Vanhaesebroeck et Alessi,

2000 ; Brazil et Hemmings, 2001). Trois isoformes d'Akt ont été caractérisées jusqu'ici dans les cellules de mammifères, soit Akt-1 (PKB α), Akt-2 (PKB β) et Akt-3 (PKB γ). Les études concernant les patrons d'expression de ces isoformes ont révélé que Akt-1 et Akt-2 étaient ubiquitaires, alors que Akt-3 était retrouvé d'une manière prédominante dans le cerveau, le cœur et les reins (Coffer et al., 1998 ; Chan et al., 1999 ; Datta et al., 1999 ; Brazil et Hemmings, 2001 ; Testa et Bellacosa, 2001). La phosphorylation sur sérine 473 d'Akt-1 est requise pour permettre son activation maximale, alors que les sites de phosphorylation correspondants sur Akt-2 (sérine 474) et Akt-3 (sérine 472) ont été identifiés, et la question sur la redondance fonctionnelle des isoformes d'Akt demeure non élucidée (Coffer et al., 1998 ; Chan et al., 1999 ; Datta et al., 1999 ; Brazil et Hemmings, 2001 ; Testa et Bellacosa, 2001). Récemment, il a été démontré qu'Akt-1, mais non Akt-2, jouait un rôle déterminant dans la suppression de l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales (Dufour et al., 2004). De plus, un grand nombre d'études ont démontré que la transfection de p57^{Akt} constitutivement actif, et dans certains cas de p57^{Akt} normal («wild-type»), bloque l'apoptose induite par des stimuli apoptotiques tels l'absence de facteurs de croissance, l'irradiation aux UVs, la perte d'adhésion cellulaire, la perturbation du cycle cellulaire, les dommages à l'ADN et le traitement de cellules avec un anticorps anti-Fas ou avec le TGF β (Chan et al., 1999 ; Datta et al., 1999 ; Vanhaesebroeck et Alessi, 2000). D'un autre côté, l'expression d'un mutant dominant négatif de p57^{Akt} bloque l'habileté d'une variété de facteurs de croissance à promouvoir la survie (Dudek et al., 1997 ; Kennedy et al., 1997 ; Khwaja et al., 1997 ; Kulik et al., 1997 ; Songyang et al., 1997 ; Berra et al., 1998 ; Chen et al., 1998 ; Crowder et Freeman, 1998 ; Gerber et al., 1998 ; Kulik et Weber, 1998 ; Yano et al., 1998 ; Weiner et Chun,

1999). L'activité d'Akt, à elle seule, est souvent suffisante pour protéger les cellules de l'apoptose en surpassant la nécessité de l'activation de la PI3-Kinase. Ainsi, l'activité d'Akt serait nécessaire et suffisante pour médier les fonctions anti-apoptotique de la PI3-Kinase.

L'effet protecteur d'Akt s'explique par la suppression de nombreuses composantes impliquées directement dans la machinerie apoptotique. Dans un premier temps, Akt peut phosphoryler l'homologue Bcl-2 pro-apoptotique Bad sur les sérines 112 et 136 (Del Peso et al., 1997 ; Coffey et Woodgett, 1998 ; Datta et al., 1999). Comme mentionné précédemment (section 2.1), ces phosphorylations permettront que Bad soit recruté par une protéine 14-3-3 qui l'emmènera vers la voie de dégradation par le protéasome (Muslin et al., 1996 ; Von Gise et al., 2001 ; Stupack et Cheresch, 2002 ; Chang et al., 2003). De plus, Akt peut phosphoryler la pro-caspase 9, une caspase initiateur, afin d'empêcher son activation (Cardone et al., 1998 ; Datta et al., 1999). Également, Akt peut phosphoryler certains facteurs de transcription de la famille « forkhead » (FKHR, FKHRL1, AFX), qui peuvent promouvoir l'expression de gènes encodant pour des cytokines comme le Fas et le TNF α (« Tumor Necrosis Factor ») (Sung et al., 1991 ; Rhoades et al., 1992 ; Dockrell et al., 1998 ; Faris et al., 1998 ; Li-Weber et al., 1998 ; Le-Niculescu et al., 1999 ; Neri et al., 2002), afin de les retenir au niveau du cytoplasme, et ainsi les empêcher d'aller au noyau agir sur leurs cibles transcriptionnelles (Biggs et al., 1999 ; Brunet et al., 1999 ; Datta et al., 1999 ; Neri et al., 2002). Enfin, Akt peut phosphoryler CREB, E2F et NF- κ B, qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la signalisation via l'insuline (IGF-1) ou via des voies de

signalisation impliquées dans la survie cellulaire (Datta et al., 1999 ; Kandel et Hay, 1999).

3. Adhésion cellulaire et survie

Il est maintenant bien établi qu'afin d'assurer leur survie, les cellules doivent interagir avec les composantes de la matrice extracellulaire (MEC). La perte de cette interaction entre la matrice et la cellule induit l'apoptose chez plusieurs types cellulaires. (Meredith et al., 1993 ; Frisch et Francis, 1994 ; Meredith et Schwartz, 1997). Cette forme particulière d'apoptose est appelée anoïkose, qui provient du grec signifiant « sans abri » (Frisch et Francis, 1994).

3.1 Les intégrines

Les intégrines font partie de quatre familles de molécules d'adhésion, comprenant aussi les sélectines, les cadhérines et la superfamille des Ig (Aplin et al., 1998 ; Gonzalez-Amaro et Sanchez-Madrid, 1999). Les intégrines jouent un rôle obligatoire dans le développement et l'homéostasie de tous les organismes multicellulaires, et sont essentielles à la vie. Ces molécules ont été décrites initialement comme étant capables d'*intégrer* le signal venant de la matrice extracellulaire vers l'intérieur de la cellule (Tamkun et al., 1986 ; Ruoslahti et Pierschbacher, 1987 ; Albelda et Buck, 1990 ; Hynes, 1992 ; Gumbiner, 1996 ; Ruoslahti, 1996). Les signaux de survie engendrés via l'adhésion cellulaire sont médiés principalement via les intégrines (figure 2). Les

intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α et d'une sous-unité β (Albelda et Buck, 1990 ; Petruzzelli et al., 1999 ; Humphries, 2000). La majorité des intégrines reconnaissent une catégorie de ligands qui sont les composantes de la matrice extracellulaire (MEC) (Petruzzelli et al., 1999). Cependant, la survie d'un type cellulaire donné implique souvent un constituant de la matrice et une intégrine spécifiques. Par exemple, les cellules épithéliales ovariennes en absence de sérum, adhérentes sur une matrice de fibronectine, sont protégées de l'anoïkose grâce à la surexpression forcée de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, tandis que la surexpression forcée de l'intégrine $\alpha \nu \beta 1$ n'a pas cet effet (Zhang et al., 1995 ; Ruoslahti, 1996). D'autres études indiquent également que les cellules épithéliales de glande mammaires entrent en anoïkose lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de collagène ou de fibronectine. Cependant, elles survivent lorsqu'elles sont cultivées sur une matrice de laminine ou sur une lame basale complète (Boudreau et al., 1995). De plus, une autre étude a démontré que les cellules épithéliales intestinales de rat étaient résistantes à l'apoptose, provoquée par une absence de sérum ou un stimulus apoptotique quelconque, lorsqu'il y avait surexpression de l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$, alors que la surexpression de l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ n'avait point cet effet protecteur (Lee et Juliano, 2000).

3.2 La kinase $p125^{FAK}$

Le recrutement au niveau des points focaux d'adhésion (FA) et l'activation de la tyrosine kinase $p125^{FAK}$ (« focal adhesion kinase ») sont des événements précoces qui surviennent suite à la liaison de la plupart des intégrines de type $\beta 1$ (Giancotti et

Ruoslahti, 1999 ; Cary et Guan, 1999). Lors de son activation, la kinase FAK s'autophosphoryle sur le résidu tyrosine 397 permettant ainsi la transmission de signaux de survie. Cette phosphorylation sur la tyrosine 397 crée un site de liaison pour le domaine SH2 de la kinase Src (Schaller et al., 1994 ; Eide et al., 1995 ; Schlaepfer et Hunter, 1998 ; Cary et Guan, 1999), permet le recrutement de la sous-unité régulatrice p85 de la PI3-kinase (Chen et al., 1996) et permet également d'activer la protéine adaptatrice Shc via Fyn, une autre tyrosine kinase membre de la famille Src (Schlaepfer et al., 1998 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999). Suite au recrutement des tyrosines kinases membres de la famille Src à p125^{FAK}, celles-ci vont phosphoryler la tyrosine 925 de la kinase FAK, créant ainsi un site de liaison pour le complexe Grb2/mSOS menant subséquemment à l'activation de la voie des MAP kinases (p42^{Erk-2}/p44^{Erk-1}) (Schlaepfer et al., 1994, Schlaepfer et al., 1998). De plus, la kinase FAK peut activer directement la PI3-Kinase ou bien indirectement via d'autres molécules de signalisation comme Src (Chen et al., 1996).

La kinase p125^{FAK} joue un rôle majeur dans la survie cellulaire (Frisch et al., 1996 ; Giancotti, 1997 ; Ilic et al., 1998). Il a été démontré que l'inhibition de FAK, soit par l'utilisation d'un ARNm antisens (Xu et al., 1996), d'un anticorps spécifique (Hungerford et al., 1996) ou de la forme dominante négative naturelle de FAK (FRNK, FAK-related nonkinase) ou d'une forme kinase inactivable générée par la mutation de la tyrosine 397 en phénylalanine (Y397F) (Renshaw et al., 1999), augmente l'incidence d'anoïkose chez plusieurs types cellulaires. Il a également été démontré que l'utilisation d'un mutant constitutivement actif de FAK protège les cellules épithéliales (Frisch et al., 1996) et les

cellules fibroblastiques (Renshaw et al., 1999) de l'anoïkose et permet leur prolifération (via l'activation des MAP kinases) en absence d'adhésion.

4. Signalisation impliquée dans l'apoptose/anoïkose.

Alors que notre compréhension des voies de signalisation responsables du maintien de la survie cellulaire augmente depuis les dernières années, les événements de signalisation impliqués dans l'induction de l'apoptose/anoïkose demeurent peu connus (Frisch et Ruoslahti, 1997 ; Giancotti, 1997 ; Frisch et Screaton, 2001).

4.1 La kinase de stress p38 (SAPK)

Les MAP kinases de stress (SAPK, « stress-activated MAP kinase »), p38 et JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase), sont des molécules de signalisation qui peuvent être activées par la présence de cytokines inflammatoires ou d'un stress environnemental (Kyriakis et Avruch, 2001). La SAPK p38, plus spécifiquement, a été identifiée comme étant un candidat potentiel pour avoir un rôle dans la mort cellulaire programmée, incluant l'anoïkose (Frisch et Ruoslahti, 1997 ; Ichijo, 1999 ; Tibbles et Woodgett, 1999 ; Frisch et Screaton, 2001 ; Kyriakis et Avruch, 2001). De plus, des études récentes ont démontré que l'activité de p38 est impliquée dans l'adhésion à la matrice et dans la signalisation induite par une blessure (Dieckgraefe et al., 1997 ; Goke et al., 1998 ; Yu et al., 2000). Dans le cas de p38 plus particulièrement, des études ont rapporté que l'activité de cette kinase était requise pour la vacuolisation (« blebbing ») membranaire et la

dégradation de l'ADN internucléosomal, autant que pour l'activation d'effecteurs de mort cellulaire (Huot et al., 1998 ; Bulavin et al., 1999 ; Ichijo, 1999 ; Pandey et al., 1999 ; Deschesnes et al., 2001 ; Kyriakis et Avruch, 2001 ; Laprise et al., 2002b).

Chez les cardiomyocytes, par exemple, l'isoforme p38 α est requise pour l'apoptose/anoïkose (Nemoto et al., 1998 ; Wang et al., 1998), alors que l'isoforme p38 β agit en tant que promoteur crucial de la survie cellulaire (Nemoto et al., 1998). Chez les myotubes de muscle squelettique différenciés, l'isoforme p38 α est requise pour l'apoptose/anoïkose, mais elle n'a aucun rôle dans la survie ou la mort des myoblastes de muscle squelettique indifférenciés (Laprise et al., 2002b ; Laprise et al., 2003). De son côté, l'isoforme p38 β ne joue aucun rôle dans la survie ou la mort cellulaire des cellules de muscle squelettiques et des myotubes (Laprise et al., 2002b ; Laprise et al., 2003). L'isoforme p38 γ , quant à elle, est exprimée dans les myofibres, mais pas dans les myoblastes et les fibroblastes (Lechner et al., 1996 ; Kyriakis et Avruch, 2001).

De ces faits, le rôle définitif de p38 dans l'anoïkose demeure quelque peu controversé. Il est évident que l'implication de p38 dans la mort cellulaire semble varier dépendamment du type cellulaire étudié (Ichijo, 1999 ; Krestow et al., 1999 ; Boucher et al., 2000 ; Noguchi et al., 2000 ; Kyriakis et Avruch, 2001 ; Laprise et al., 2002b ; Laprise et al., 2003). De plus, l'expression d'isoformes de p38 peut varier d'un type cellulaire à un autre et selon l'état de différenciation (Li et al., 1996 ; Jiang et al., 1997 ; Ichijo, 1999 ; Kyriakis et Avruch, 2001). Finalement, il devient extrêmement évident que les quatre isoformes connues de p38 (α , β , γ , δ) peuvent être impliquées dans les mécanismes de survie cellulaire, dans l'apoptose/anoïkose ou n'avoir aucun rôle, dépendamment du type cellulaire étudié et de l'état de différenciation (Nemoto et al.,

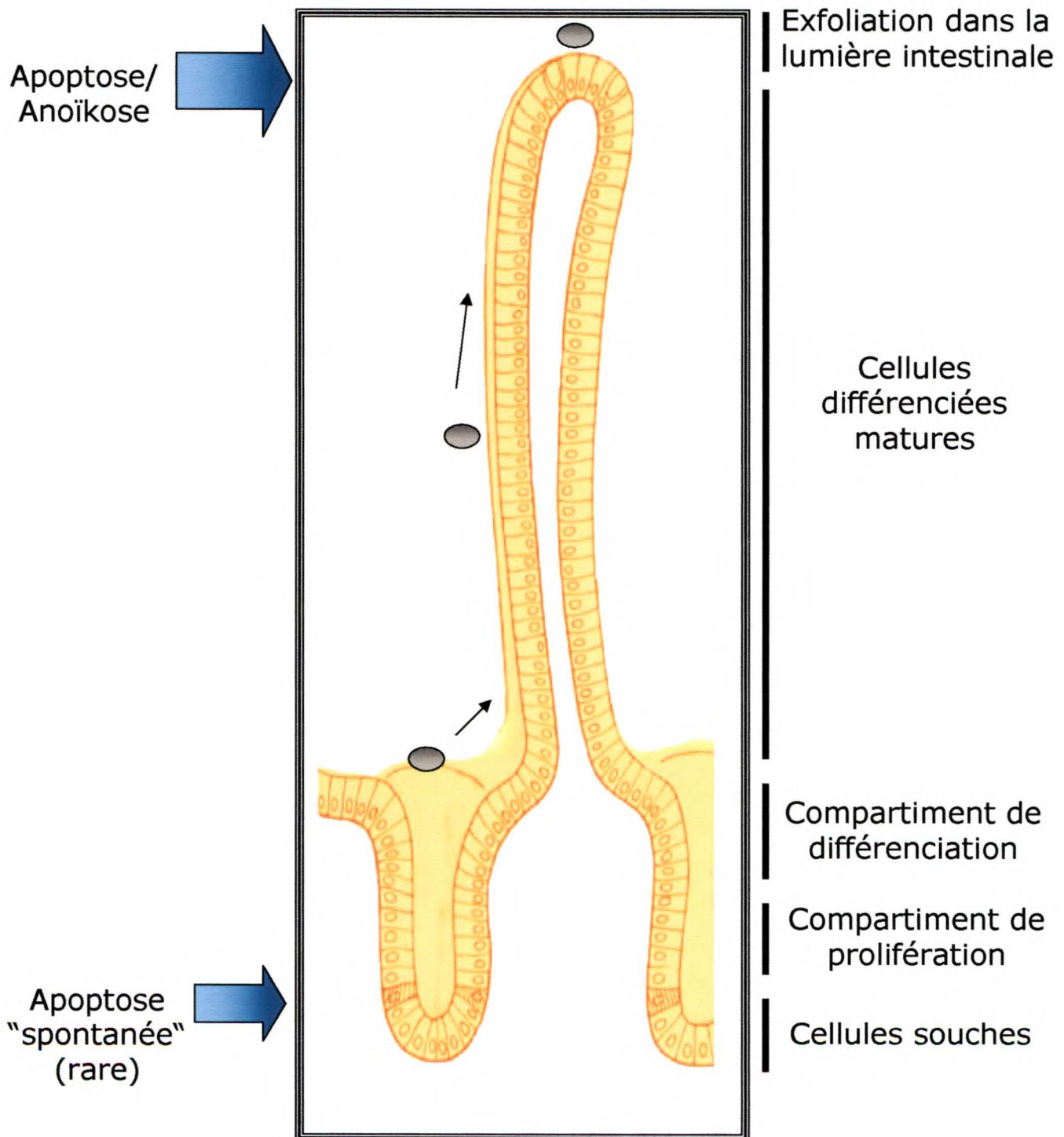
1998 ; Wang et al., 1998 ; Enslen et al., 2000 ; Kyriakis et Avruch, 2001 ; Laprise et al., 2002b).

5. Épithélium intestinal

5.1 Le modèle

L'épithélium intestinal est un modèle utile pour l'étude des mécanismes impliqués dans le renouvellement tissulaire, incluant l'apoptose. Ce système de renouvellement tissulaire est rapide, continu et est compartimentalisé en ce qui a trait à la prolifération et la différenciation. Ainsi, les cellules souches sont à la base de la crypte, il y a un compartiment de prolifération, situé dans la demie inférieure de la crypte, ainsi qu'un compartiment de différenciation, situé au niveau de la villosité (figure 3) (Leblond, 1981 ; Gordon et Herminston, 1994 ; Jones et Gores, 1997 ; Potten, 1997). Ce « gradient » de différenciation entérocytaire le long de l'axe crypte-villosité est surtout défini par des propriétés fonctionnelles que les entérocytes pleinement différenciés possèdent et qui les distinguent des cellules cryptales (Ménard et Beaulieu, 1994 ; Jones et Gores, 1997 ; Potten, 1997 ; Pageot et al., 2000). Cependant, les bases moléculaires du processus dynamique de production dans les cryptes, et la migration de ces cellules jusqu'à l'apex des villosités, demeurent mal connus (Gordon et Herminston, 1994 ; Jones et Gores, 1997 ; Potten, 1997). Les mécanismes moléculaires d'apoptose qui font partie intégrante du processus dynamique de renouvellement épithélial tissulaire le long de l'axe crypte-villosité, sont également mal connus.

Figure 3. Compartimentalisation spatiale cellulaire et localisation de l'apoptose le long de l'axe crypte-villosité de l'épithélium intestinal humain. Les cellules souches sont situées à la base de la crypte. Le compartiment de prolifération est situé dans la partie inférieure de la crypte. Le compartiment de différenciation, situé au niveau de la villosité, comprend les cellules à divers stades de différenciation. L'apoptose/anoïkose au niveau de l'apex des villosités constitue un processus normal, alors que l'apoptose « spontanée » des cellules cryptales est un processus moins fréquent qui sert à enlever les cellules défectueuses ou endommagées.



5.2 Mécanismes de survie distincts selon l'état de différenciation entérocytaire

Les réponses hormonales, ainsi que les composantes d'adhésion cellulaire, comme les intégrines, soulignent des distinctions additionnelles entre les entérocytes de la crypte et ceux de la villosité (Potten, 1992 ; Podolsky, 1993 ; Ménard et Beaulieu, 1994 ; Drucker, 1997 ; Potten, 1997 ; Beaulieu, 1999 ; Pageot et al., 2000 ; Stutzmann et al., 2000). L'apoptose des entérocytes différenciés au niveau de l'apex des villosités constitue un processus normal, alors que l'apoptose « spontanée » des cellules cryptales est un processus moins fréquent qui sert à enlever les cellules défectueuses ou endommagées (figure 3) (Potten, 1992 ; Hall et al., 1994 ; Moss et Holt, 1996 ; Jones et Gores, 1997 ; Potten, 1997 ; Grossmann et al., 1998 ; Vachon et al., 2000). D'ailleurs, l'apoptose retrouvée au niveau de la villosité est en fait de l'anoïkose. Cette différence apparente au niveau du devenir des cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées sous-tend des mécanismes de régulation distincts de survie le long de l'axe crypte-villosité (Moss et Holt, 1996 ; Potten, 1997 ; Gauthier et al., 2001a ; Gauthier et al., 2001b). Ce concept est maintenant accepté et supporté par plusieurs évidences : 1) l'augmentation notable de l'apoptose cryptale par rapport à l'apoptose villositaire chez les rongeurs, suite à l'irradiation ou à la présence d'agents chimiothérapeutiques (Potten, 1992 ; Hall et al., 1994 ; Merrit et al., 1995 ; Hirose et al., 1997 ; Potten, 1997 ; Pritchard et al., 1999) ; 2) l'expression différentielle des homologues Bcl-2 le long de l'axe crypte-villosité (voir section 5.2.1) (LeBrun et al., 1993 ; Vachon et al., 2000 ; Gauthier et al., 2001a ; Gauthier et al., 2001b ; Vachon et al., 2001 ; Cory et Adams, 2002) et 3) les voies de signalisation impliquées distinctivement dans la survie et l'apoptose des cellules

épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées (figure 4) (voir sections 5.2.2 à 5.2.5) (Lévy et al., 1998 ; Gauthier et al., 2001a ; Vachon et al., 2002 ; Lévy et al., 2003 ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004).

5.2.1 Les homologues Bcl-2 sont exprimés différemment au cours de la différenciation entérocytaire

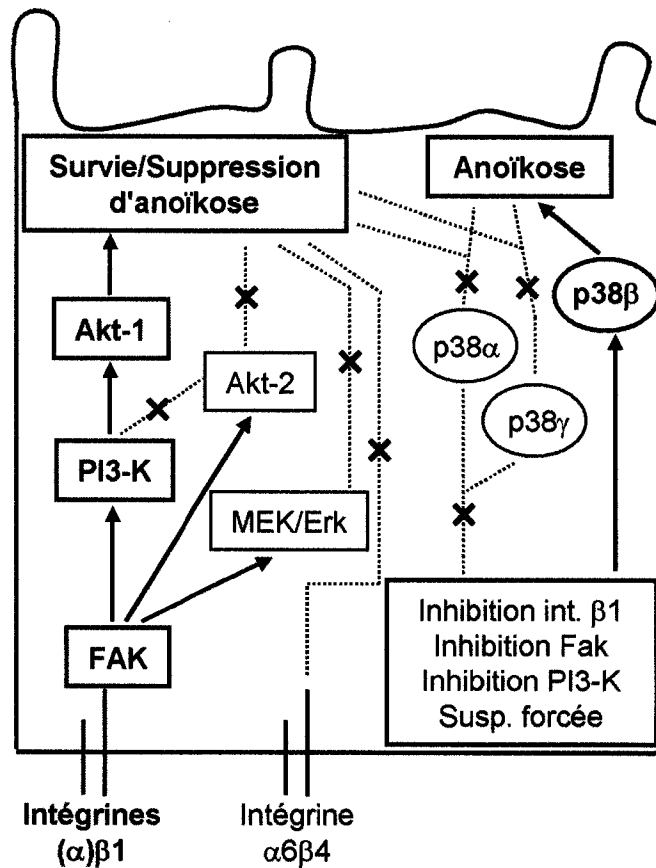
Puisque les homologues Bcl-2 exercent un rôle crucial dans la phase décisionnelle de l'apoptose, il a été suggéré que les gradients d'expression différentiels de ceux-ci, observés le long de l'axe crypte-villosité (Lebrun et al., 1993 ; Merritt et al., 1995 ; Hirose et al., 1997 ; Vachon et al., 2000 ; Cory et Adams, 2002) pourraient refléter un moyen de régulariser la survie entérocytaire de façon différentielle (Potten, 1992, 1997 ; Jones et Gores, 1997). Il a déjà été démontré qu'il y a établissement de profils distincts d'expression pour les homologues Bcl-2 anti-apoptotiques Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1, et pour les pro-apoptotiques Bax, Bak et Bad, tout au long du processus de différenciation entérocytaire. Les gradients d'expression observés *in vitro* (figure 4) (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004) viennent appuyer les résultats d'une étude sur l'expression des homologues Bcl-2 *in vivo* le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin grêle humain (18-20 semaines), qui montrait clairement la présence de gradients d'expression différentiels pour ces homologues le long de l'axe (Vachon et al., 2000). Par conséquent, cela démontre que l'expression de profils distincts d'homologues Bcl-2 s'acquiert au cours du processus entérocytaire, et que ces profils distincts sous-tendent des mécanismes différentiels de régulation d'expression d'homologues.

Figure 4. Régulation différentielle de la survie cellulaire et de l'apoptose/anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation entérocytaire. Chez les cellules indifférenciées: les intégrines $\beta 1$, Fak, la PI3-K et Akt-1 sont cruciales pour la survie et la suppression de l'anoïkose, tandis que p38 β est requise pour l'induction du processus. Cependant, Akt-2 et la voie MEK/Erk ne jouent pas de rôle dans la suppression ou l'induction de l'anoïkose, et ce malgré que la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak qui contribue à leur stimulation ; d'ailleurs, Akt-2 est par surcroît indépendante de PI3-K. p38 α et p38 γ (mais non pas p38 δ) sont exprimées, mais ne jouent pas de rôle dans la survie ou l'induction de l'anoïkose. Enfin, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ ne participe pas dans le maintien de la survie, tandis que Akt-3 n'est pas exprimée. Chez les cellules différenciées : les intégrines $\beta 1$, Fak, la PI3-K et Akt-1 demeurent cruciales pour la suppression de l'anoïkose, tandis que c'est p38 δ qui est ici requise pour l'induction du processus. p38 α et p38 γ (mais non pas p38 β) sont encore exprimées et ne jouent toujours pas de rôle dans la survie ou l'induction de l'anoïkose. La voie MEK/Erk demeure influençable par la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak mais, ici, contribue de façon mineure dans la survie. De plus, l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ contribue cette fois-ici à la suppression de l'anoïkose, mais également de façon mineure. D'un autre côté, Akt-2 demeure indépendante de la PI3-K en plus d'être maintenant indépendante de la signalisation intégrines $\beta 1$ /Fak, mais ne joue toujours pas de rôle dans la suppression ou l'induction de l'anoïkose. Enfin, Akt-3 n'est toujours pas exprimée.

Cellule épithéliale intestinale indifférenciée

(s'applique aux cellules HIEC, Caco-2/15 -2 PC)

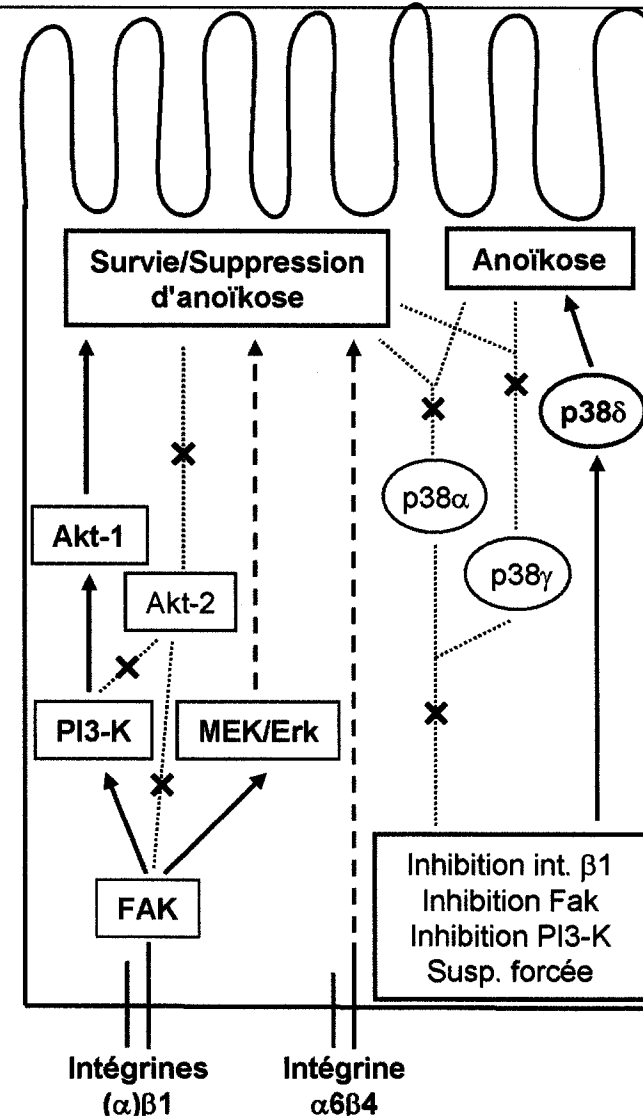
- *Homologues Bcl-2 prédominants:*
Anti-apoptotiques: Bcl-2, Bcl-X_L
Pro-apoptotiques: Bax
- p38δ, Akt-3: *pas exprimées*



Cellule épithéliale intestinale différenciée

(s'applique aux cellules PCDE, Caco-2/15 30 PC)

- *Homologues Bcl-2 prédominants:*
Anti-apoptotiques: Mcl-1
Pro-apoptotiques: Bak, Bad
- p38β, Akt-3: *pas exprimées*



5.2.2 FAK et l'adhésion cellulaire dans la survie cellulaire et l'apoptose/anoïkose selon l'état de différenciation entérocytaire

Les cellules épithéliales intestinales montrent des susceptibilités distinctes à l'apoptose/anoïkose selon leur état de différenciation. En effet, les cellules différenciées sont plus susceptibles à l'apoptose/anoïkose que les cellules indifférenciées (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004). De plus, une modulation importante des niveaux relatifs d'activation de la kinase FAK au cours de la différenciation est observée. En effet, les niveaux d'activation de FAK sont plus élevés chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées que chez les cellules différenciées (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004). Ceci résulte en des profils distincts d'activation de FAK au cours du processus de différenciation entérocytaire (figure 4). Il est également bien connu que FAK est largement responsable de la signalisation par l'intégrine $\beta 1$ (Frisch et Ruoslahti, 1997 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Coppelino et Dedhar, 2000). Il a été démontré que l'intégrine $\beta 1$ était importante pour la survie des cellules épithéliales intestinales tant indifférenciées que différenciées, alors que l'intégrine $\beta 4$ jouait un rôle mineur dans la survie des cellules indifférenciées seulement (figure 4) (Gauthier et al., 2001a ; Dufour et al., 2004).

5.2.3 Implication différentielle de la voie de signalisation MEK/Erk dans la survie cellulaire selon l'état de différenciation entérocytaire

En analysant le rôle de la voie MEK/Erk au niveau de la survie cellulaire chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées, il a été démontré que ce rôle était différentiel selon l'état de différenciation (Gauthier et al., 2001a). En effet, la voie MEK/Erk est impliquée dans la survie des cellules différenciées, mais ne joue pas de rôle dans la survie des cellules indifférenciées (figure 4) (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004). De plus, une modulation importante des niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 au cours de la différenciation est observée. En effet, les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 sont plus élevés chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées, suggérant ainsi un rôle différentiel pour la voie MEK/Erk (Lévy et al, 1998 ; Aliaga et al., 1999 ; Gauthier et al, 2001a). De plus, l'inhibition de la voie MEK/Erk n'a pas d'effet sur la survie des cellules indifférenciées, tandis que chez les cellules différenciées, l'inhibition de cette voie induit l'apoptose (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004).

5.2.4 Implication de la voie de signalisation PI3-K/Akt dans la survie cellulaire selon l'état de différenciation entérocytaire

Par l'étude de la voie de signalisation PI3-K/Akt, il a été démontré que la PI3-K était impliquée dans la survie des cellules épithéliales intestinales tant indifférenciées que différenciées (figure 4) (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004). Récemment, il a été démontré qu'Akt-1 est un déterminant crucial dans la

suppression de l'anoïkose entérocytaire, alors qu'Akt-2 est PI3-K-indépendant et ne joue aucun rôle dans la survie ou la mort cellulaire entérocytaire (figure 4) (Dufour et al., 2004). De plus, une modulation des niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 au cours de la différenciation est observée. En effet, les niveaux d'activation d'Akt-1 sont plus élevés chez les cellules épithéliales intestinales différenciées (Dufour et al., 2004). Il est à noter qu'Akt-3 n'est pas exprimée chez les cellules épithéliales intestinales (figure 4) (Dufour et al., 2004).

5.2.5 Implication de la SAPK p38 dans la signalisation apoptose/anoïkose selon l'état de différenciation entérocytaire

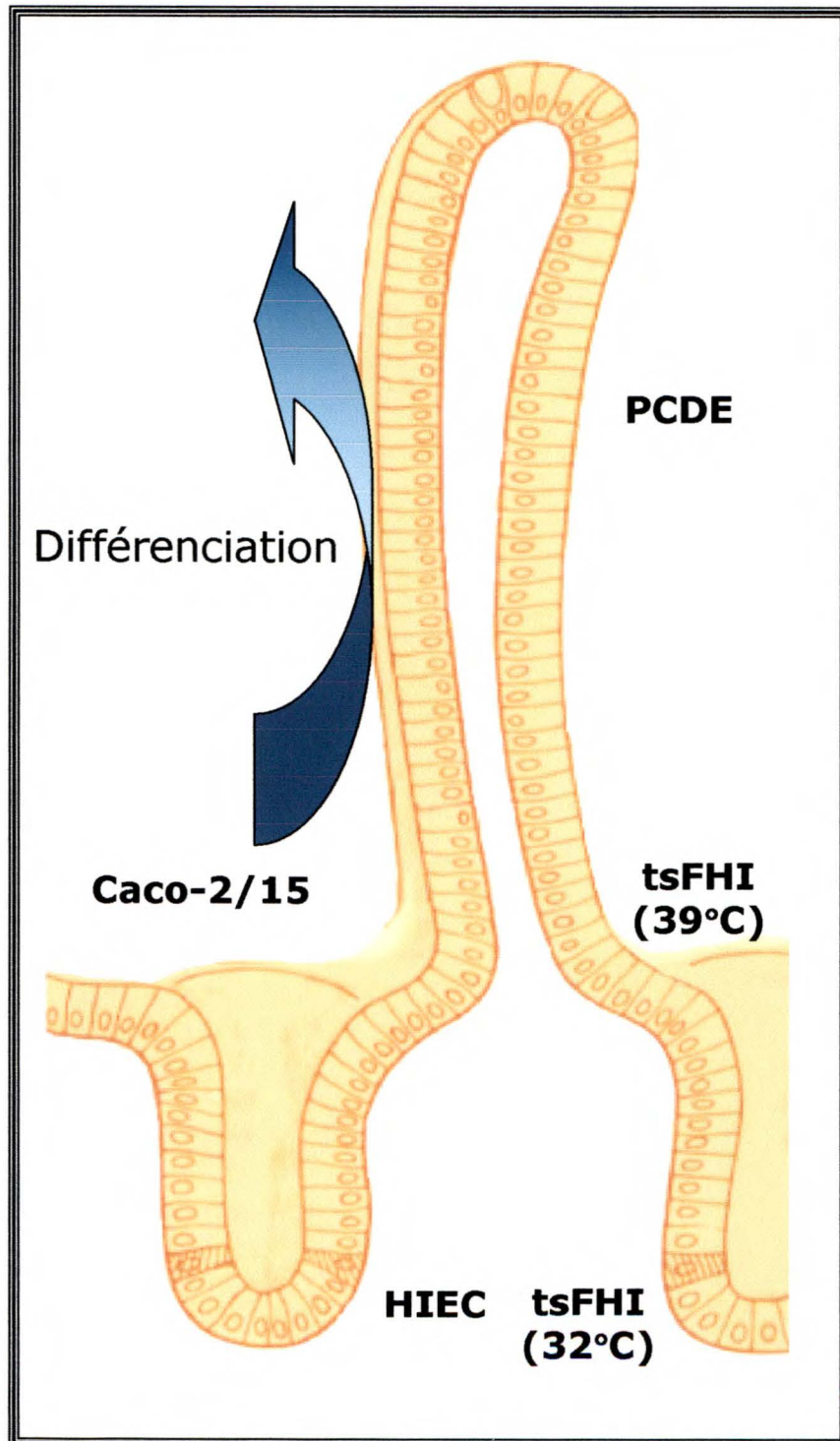
L'isoforme p38 α a été démontrée comme jouant un rôle primordial au niveau du processus de différenciation entérocytaire (Houde et al., 2001 ; Laprise et al., 2002a), mais n'est pas impliquée dans la survie ou la mort cellulaire entérocytaire (figure 4) (Ding et al., 2001 ; Vachon et al., 2002). L'isoforme p38 β est requise pour l'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées seulement (figure 4) (Vachon et al., 2002). L'isoforme p38 γ , quant à elle, est exprimée chez les cellules épithéliales intestinales tant indifférenciées que différenciées, mais n'est pas impliquée dans la survie ou la mort cellulaire entérocytaire (figure 4) (Vachon et al., 2002). Finalement, l'isoforme p38 δ est exprimée exclusivement chez les cellules épithéliales intestinales différenciées et elle est requise pour leur processus d'anoïkose entérocytaire (figure 4) (Vachon et al., 2002).

6. *Modèles in vitro de différenciation entérocytaire humaine*

Jusqu'à maintenant, il n'existe aucun modèle cellulaire *in vitro* capable de reconstituer pleinement le processus de différenciation le long de l'axe crypte-villosité humain. Les cellules HIEC (« human intestinal epithelial cells ») sont un modèle cellulaire représentatif des cellules de la crypte qui ne peuvent être induites à se différencier (figure 5) (Perreault et Beaulieu, 1996). Ces cellules sont surtout utilisées pour des études portant sur la régulation de la prolifération entérocytaire. Il existe également des cultures primaires d'entérocytes normaux pleinement différenciés, soient les PCDE (« Primary Culture of Differentiated Enterocytes ») (figure 5) (Perreault et Beaulieu, 1998). Étant donné leur incapacité à proliférer, due à l'absence de cellules prolifératives, les PCDE peuvent être maintenues seulement en tant que cultures primaires, et ce, pour de très courtes durées (Pageot et al., 2000). De plus, il existe les cellules tsFHI (« temperature-sensitive fetal human intestinal cells ») qui sont des cellules transformées à l'aide d'un antigène SV40 thermosensible (figure 5) (Quaroni et Beaulieu, 1997). À la température permissive (32°C), les cellules tsFHI prolifèrent et exhibent les marqueurs de cellules cryptales. À la température non permissive (39°C), les cellules cessent irréversiblement de proliférer et acquièrent un phénotype plus différencié (Quaroni et Beaulieu, 1997 ; Pageot et al., 2000).

Les cellules Caco-2 sont une lignée provenant d'un adénocarcinome de côlon humain (Fogh et al., 1977). Cette lignée constitue un bon modèle *in vitro* pour l'étude de la régulation de la différenciation entérocytaire (figure 5) (Beaulieu et Quaroni, 1991 ; Vachon et Beaulieu, 1992 ; Vachon et al., 1996b).

Figure 5. Modèles in vitro de différenciation entérocytaire. Les cellules HIEC (« human intestinal epithelial cells ») sont un modèle cellulaire représentatif des cellules de la crypte qui ne peuvent être induites à se différencier. Les cellules PCDE (« Primary Culture of Differentiated Enterocytes ») sont des cultures primaires d'entérocytes normaux pleinement différenciés. Les cellules tsFHI (« temperature-sensitive fetal human intestinal cells ») prolifèrent et exhibent les marqueurs de cellules cryptales à la température permissive (32°C), alors qu'elles cessent irréversiblement de proliférer et acquièrent un phénotype plus différencié à la température non permissive (39°C). Les cellules Caco-2/15 sont un clone provenant de la lignée originale Caco-2. Les cellules Caco-2/15 sont des cellules prolifératives, mais lorsqu'elles atteignent la confluence, elles cessent de proliférer pour entamer un processus de différenciation complet après 20-30 jours post-confluence.



Chez les cellules Caco-2, l'acquisition graduelle des caractéristiques d'entérocytes différenciés est reconnue comme étant un processus hautement régularisé (Zweibaum et Chantret, 1989 ; Ménard et Beaulieu, 1994). À l'atteinte de la confluence, la prolifération cellulaire cesse et les cellules atteignent un nombre stationnaire (Pinto et al., 1983 ; Zweibaum et Chantret, 1989 ; Beaulieu et Quaroni, 1991 ; Jumarie et Malo, 1991). Les cellules Caco-2 sont uniques dans leur propriété à pouvoir initier leur différenciation dès l'atteinte de la confluence, acquérant ainsi après 20 à 30 jours post-confluence, un degré de différenciation entérocytaire morphologique et fonctionnel qui s'apparente fortement au phénotype de l'entérocyte/colonocyte foetal pleinement différencié (Pinto et al., 1983 ; Zweibaum et Chantret, 1989 ; Vachon et Beaulieu, 1992 ; Vachon et al., 1996b). En effet, il est bien établi qu'à partir de 18-20 semaines de gestation, tout l'épithélium de l'intestin grêle et du côlon est organisé selon un axe crypte-villosité et exprime tous les marqueurs de différenciation entérocytaire connus (ex : sucrase-isomaltase, lactase, etc.) ; ainsi, les cellules Caco-2 pleinement différenciées exprimeront également ces mêmes marqueurs de différenciation entérocytaire (Pinto et al., 1983 ; Beaulieu et Quaroni, 1991 ; Ménard et Beaulieu, 1994). Pour nos études, nous avons utilisé les cellules Caco-2/15, un clone provenant de la lignée originale Caco-2, exprimant des niveaux élevés du marqueur de différenciation sucrase-isomaltase (figure 5) (Beaulieu et Quaroni, 1991).

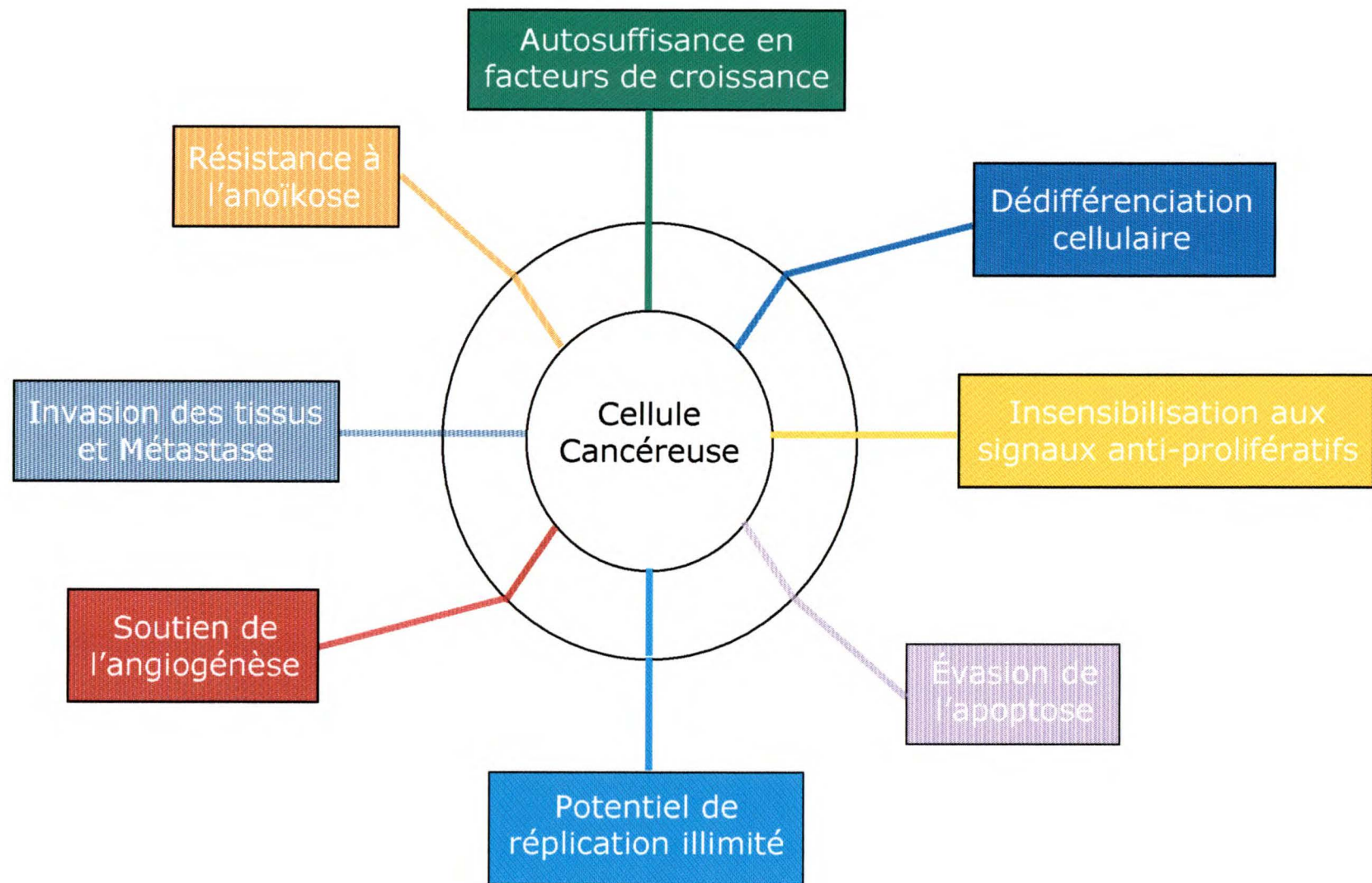
7. Le cancer

Après un quart de siècle d'avancées rapides, la recherche sur le cancer a généré un savoir riche et complexe sur le corps humain, révélant le cancer comme étant une

maladie impliquée dans des changements dynamiques dans le génome. Les altérations présentes dans les cellules cancéreuses humaines et animales ont été tout d'abord définies en deux classes de mutations : les oncogènes avec des gains de fonction dominants et les gènes suppresseurs de tumeur avec des pertes de fonction récessives. Par la suite, la recherche des origines et des traitements du cancer a ajouté plusieurs degrés de complexités (Sporn, 1996 ; DePinho, 2000 ; Hanahan et Weinberg, 2000). Plusieurs évidences indiquent que la tumorigénécité est un processus en plusieurs étapes, et que ces étapes reflètent les altérations génétiques qui conduisent la transformation progressive des cellules normales en cellules malignes (Foulds, 1954 ; Nowell, 1976 ; Evan et Littlewood, 1998 ; Hanahan et Weinberg, 2000). Lors des étapes de la progression cancéreuse, les cellules vont non seulement entamer un processus de dédifférenciation, mais elles vont également conserver la majorité de leurs fonctions originales (Liotta et Kohn, 2004 ; Okada et Mak, 2004).

Jusqu'à maintenant, le génotype des cellules cancéreuses est une manifestation de huit altérations essentielles dans la physiologie de la cellule permettant sa croissance maligne : dédifférenciation cellulaire, autosuffisance en facteurs de croissance, insensibilisation aux signaux anti-prolifératifs, évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose), résistance à l'anoïkose, potentiel de réplication illimité, soutien de l'angiogénèse et invasion des tissus et métastase (figure 6) (Fynan et Reiss, 1993 ; Markowitz et al., 1995 ; Bouck et al., 1996 ; Hanahan et Folkman, 1996 ; Harris, 1996 ; Schutte et al., 1996 ; Fedi et al., 1997 ; Folkman, 1997 ; Hayflick, 1997 ; Levine, 1997 ; Christofori et Semb, 1999 ; Hanahan et Weinberg, 2000 ; Liotta et Kohn, 2004).

Figure 6. Capacités acquises chez une cellule cancéreuse. Plusieurs évidences indiquent que la tumorigénécité est un processus en plusieurs étapes, et que ces étapes reflètent les altérations génétiques qui conduisent la transformation progressive des cellules normales en cellules malignes. Le génotype des cellules cancéreuses est une manifestation de huit altérations essentielles dans la physiologie de la cellule permettant sa croissance maligne : dédifférenciation cellulaire, autosuffisance en facteurs de croissance, insensibilisation aux signaux anti-prolifératifs, évasion de la mort cellulaire programmée (apoptose), potentiel de réplication illimité, résistance à l'anoïkose, soutien de l'angiogénèse et invasion des tissus et métastase.



Finalement, les cellules cancéreuses doivent non seulement acquérir des avantages de prolifération et de survie, mais également développer une résistance à l'anoïkose (Liotta et Kohn, 2004).

7.1 La signalisation de survie et le cancer

Des altérations dans les voies de signalisation de survie sont également cruciales pour la cancérogenèse, car elles peuvent supprimer ou altérer l'apoptose. La surexpression d'oncogènes comme Ras, Raf, Rac et Src ainsi que la délétion de gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN et p53, peuvent rendre les cellules cancéreuses résistantes à l'anoïkose (Frisch et Francis, 1994 ; Re et al., 1994 ; Nikiforov et al., 1996 ; McGill et al., 1997 ; Nikiforov et al., 1997 ; Ilic et al., 1998 ; Rytomaa et al., 2000 ; Coniglio et al., 2001 ; Maehama et al., 2001 ; McFall, et al., 2001 ; Rosen et al., 2001).

Évidemment, lorsqu'on parle de résistance à l'anoïkose, on parle de survie adhésion indépendante. Les intégrines sont alors impliquées, mais il est important de noter que ce ne sont pas toutes les lignées cellulaires cancéreuses qui possèdent un potentiel métastatique (Clezardin, 1998 ; Grossmann, 2002). Par exemple, la surexpression de certaines intégrines dans les cellules de cancer du sein peut promouvoir des signaux de survie essentiels (Shaw et al., 1997 ; Bachelder et al., 1999 ; Bachelder et al., 2001), alors que d'autres intégrines pourraient servir de marqueur de détection pour un cancer ovarien puisqu'elles ne sont pas présentes dans l'épithélium normal (Ahmed et

al. 2002). De plus certaines intégrines peuvent présenter un intérêt particulier puisqu'elles sont exprimées d'une manière prédominante dans les cellules tumorales de cancer du sein (Albelda et al., 1990 ; Brooks et al., 1995 ; Varner et al., 1995 ; Varner et Cheresh, 1996) ; leur blocage simulerait une perte d'adhésion cellulaire, induisant de ce fait l'anoïkose ainsi qu'une régression subséquente de la tumeur (Brooks et al., 1994 ; Kerr et al., 1999 ; Liu et al., 2000 ; Mitjans et al., 2000).

L'élément clé dans la transduction de signal par les intégrines est la kinase FAK. Plusieurs études ont démontré une surexpression de FAK dans les carcinomes ovariens, les tumeurs orales, les cellules de kératinocytes malignes et dans les tumeurs malignes de cancer du sein (Agochiya et al., 1999 ; Judson et al., 1999 ; Cance et al., 2000 ; Schneider et al., 2002). Il a également été démontré que la kinase FAK pouvait être constitutive active dans les mélanomes malins (Kahana et al., 2002). FAK peut aussi être impliquée dans la résistance à l'anoïkose. En effet, si le gène de FAK est silencieux («silencing gene»), cela favorise l'anoïkose et renverse la résistance acquise à l'anoïkose (capacité métastatique) des cellules cancéreuses pancréatiques (Duxbury et al., 2004).

Plusieurs évidences ont démontré l'implication de Src dans le développement de cancers humains (Irby et al., 1997 ; Irby et Yeatman, 2000). Tout comme l'oncogène v-Src, les mutants actifs de c-Src peuvent transformer des cellules en culture et induire la formation de tumeurs *in vivo* (Levy et al., 1986 ; Tanaka et Fujita, 1986 ; Tanaka et al., 1990 ; Lin et al., 1995). De plus, plusieurs études ont reporté que les niveaux d'expression et/ou d'activité de la protéine Src étaient élevées dans les cancers

épithéliaux et dans les lignées cellulaires dérivées (Frame, 2002). On retrouve effectivement des niveaux élevés de Src dans les lignées de cancer du sein (Rosen et al., 1986 ; Muthuswamy et Muller, 1994 ; Verbeek et al., 1996 ; Egan et al., 1999), de cancer du pancréas (Lutz et al., 1998), de cancer ovarien (Budde et al., 1994 ; Wiener et al., 1999), de cancer gastriques (Takeshima et al., 1991) et bien d'autres encore (Frame, 2002).

Une voie de signalisation impliquée dans la survie, mais aussi responsable des processus de prolifération et de différenciation cellulaires, est la voie des MAPK (Erk-1/Erk-2). L'activation constitutive active de cette voie de signalisation a été démontrée dans plusieurs cas de cancers (Hoshino et al., 1999). La voie des MEK/Erk a aussi été démontrée primordiale pour la survie des cellules cancéreuses pancréatiques (Boucher et al., 2000). Malheureusement, les études concernant l'implication de la voie MEK/Erk dans la survie des cellules cancéreuses sont peu nombreuses, étant donné qu'elle est surtout connue pour son rôle dans la prolifération cellulaire. Évidemment, les mécanismes qui régissent le rôle de la voie MEK/Erk dans la survie cellulaire dans un contexte de cancérogenèse demeurent à être compris.

La voie de signalisation PI3-K/Akt est sans nul doute la voie de survie la plus importante. Le signal provenant de cette voie sera évidemment suractivé dans un grand nombre de types de tumeurs (Vivanco et Sawyers, 2002). Le gène qui encode pour la sous-unité catalytique p110 de la PI3-K est souvent amplifié et constitutif actif dans des cas de cancers ovariens (Shayeseh et al., 1999). La sous-unité régulatrice p85 de la PI3-K

peut aussi être la cible de mutations dans des cancers. La forme tronquée p65, isolée originellement d'un lymphome, cause l'activation constitutive active de la PI3-K et permet la transformation cellulaire (Jimenez et al., 1998 ; Philp et al., 2001). Plusieurs études ont également démontré une surexpression de l'isoforme Akt-2 dans des cancers du sein, des cancers ovariens (Bellacosa et al., 1995 ; Yuan et al., 2000 ; Arboleda et al., 2003) et des cancers pancréatiques (Cheng et al., 1996 ; Ruggeri et al., 1998) contribuant ainsi à la transformation des cellules cancéreuses en augmentant leur degré de survie et en favorisant leur potentiel métastatique.

7.2 Le cancer du côlon

Le cancer colorectal est la deuxième cause majeure de mort par le cancer en Amérique du Nord (Midgley et Kerr, 1999 ; Yang, 2002 ; Koornstra et al., 2003). Le développement du cancer colorectal est caractérisé par une accumulation d'altérations moléculaires génétiques causant des désordres dans la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Koornstra et al., 2003). Ces altérations génétiques peuvent se manifester par l'activation d'oncogènes et la perte de gènes suppresseurs de tumeur (Fearon et Vogelstein, 1990). Dans certains cas, la prédisposition héréditaire au cancer colorectal est due à la transmission d'une mutation dans le gène APC (adenomatous polyposis coli) (Grodin et al., 1991 ; Kinzler et al., 1991 ; Yang, 2002) ou à une anomalie dans la réparation somatique de l'ADN (Modrich, 1994), mais pour la majorité des cas, les facteurs responsables des changements génétiques et

morphologiques sont inconnus. La caractéristique la plus importante lors du développement du cancer colorectal est l'acquisition graduelle de résistance à l'apoptose (Moss et al., 1996). Cette inhibition de l'apoptose peut se manifester par différentes stratégies qui sont nombreuses et variées et qui sont adoptées par les tumeurs colorectales et/ou les lignées cellulaires dérivées (Bedi et al., 1995).

Les homologues Bcl-2 qui contrôlent la phase décisionnelle pour l'entrée en apoptose peuvent aussi être la cible de dérégulations dans plusieurs cas de cancers du côlon. Par exemple, l'expression de l'homologue anti-apoptotique Bcl-2 est souvent très élevée dans la phase précoce du cancer, soit les adénomes colorectaux, et elle diminue suivant l'évolution du cancer (Hague et al., 1994 ; Valentini et al., 1999). De plus, les homologues anti-apoptotiques Bcl-X_L et Bcl-w sont surexprimés, quant à eux, dans les adénocarcinomes de côlon, une phase plus avancée dans le cancer (Krajewska et al., 1996 ; Wilson et al., 2000).

Chez plusieurs lignées dérivées de carcinomes de côlon, l'expression d'une intégrine en particulier peut servir de marqueur cancérigène puisque cette dernière n'est pas présente dans l'épithélium normal et elle favoriserait la tumorigénécité (Agrez et al., 1994). Une étude a récemment démontré que l'inhibition de l'intégrine, par une molécule antagoniste, provoquait l'anoïkose chez des cellules carcinomateuses de côlon humain, mais les cellules demeuraient en vie grâce à la formation de grappes (« clusters ») (Burridge et al., 2003).

Il a également été démontré que les kinases FAK et Src étaient surexprimées dans les cancers du côlon (Park et Cartwright, 1995 ; Irby et al., 1999 ; Cance et al., 2000 ; Irby et Yeatman, 2000 ; Frame, 2002 ; Lark et al., 2003). Une étude a récemment montré que les cellules cancéreuses de côlon recevaient des signaux de survie provenant des activités de FAK et de Src, suggérant que la combinaison de ces signaux pouvait contribuer à leur résistance à l'apoptose. Il a alors été démontré que seule une inhibition combinée de FAK et Src était effective pour induire l'apoptose dans des lignées de cancer du côlon (Golubovskaya et al., 2003). Il est également bien connu que dans plusieurs cas de cancer du côlon, il y a présence d'une mutation sur le résidu tyrosine 530, qui est bien connu pour réguler négativement l'activité de la kinase Src par la phosphorylation du résidu. Cette mutation est présente dans 12% des cancers du côlon avancés et provoque une nature constitutive active de Src (Irby et al., 1999). Par contre, plusieurs autres études ont montré l'absence de cette mutation dans plusieurs cancers colorectaux (Daigo et al., 1999 ; Wang et al., 2000a ; Laghi et al., 2001).

La voie de signalisation MEK/Erk joue un rôle central dans la signalisation ligand-indépendante acquise par les cellules cancéreuses (Lee et al., 2004). Par exemple, dans les carcinomes de côlon humain, environ la moitié des tumeurs portent un oncogène ras mutant (Medema et Bos, 1993 ; Kinzler et Vogelstein, 1996 ; Hunter, 1997). Par contre, certaines études se contredisent en ce qui concerne les MAPK Erk et p38. En effet, une étude démontrait une augmentation d'activité des Erk (Licato et Brenner, 1998), une autre démontrait une baisse d'activité des Erk dans les tumeurs colorectales comparativement aux tissus sains adjacents (Wang et al., 2000b), alors qu'une autre étude

démontrait qu'il n'y avait aucun changement dans les niveaux d'activation des Erk (Miki et al., 1999). Le même scénario se répète en ce qui concerne la kinase de stress p38 : une étude montre une diminution de l'activité de p38 dans les tumeurs colorectales (Wang et al., 2000b), alors qu'une autre démontre une augmentation de l'activation de p38 par rapport au tissu sain adjacent (Miki et al., 1999).

La PI3-K est une protéine que nous pouvons facilement soupçonner qu'elle pourrait avoir un rôle dans plusieurs cas de cancers du côlon. Dans quelques études, une augmentation des niveaux de p85, suivie d'une augmentation de l'activité de la PI3-K, ainsi que des niveaux de phosphorylation de son effecteur Akt, ont été démontrées dans plusieurs cas de tumeurs colorectales (Phillips et al., 1998 ; Itoh et al., 2002). Des mutations au niveau de la sous-unité p85 α ont également été détectées chez des tumeurs colorectales provoquant un état constitutif actif de la PI3-K et conférant une évidence au fait que p85 α serait un nouvel oncogène impliqué dans la tumorigénèse (Philp et al., 2001). Par contre, ces mutations ne sont pas présentes chez toutes les lignées cellulaires dérivées d'un cancer colorectal. Certaines de ces lignées sont sensibles au LY294002, un inhibiteur de la PI3-K. En effet, le LY294002 démontre une augmentation de l'apoptose cellulaire, qui corrèle avec une diminution de la phosphorylation d'Akt chez plusieurs lignées de cancer colorectal (Semba et al., 2002 ; Wang et al., 2002).

7.3 Modèles *in vitro* de cancer du côlon

Aujourd'hui, il existe une très grande variété de modèles *in vitro* représentatifs de l'évolution du cancer du côlon. En effet, il existe plusieurs lignées cellulaires qui possèdent différents degrés de dédifférenciation. Parmi celles-ci, il y a les lignées de la famille des Colo, de la famille des SW, les LoVo, les DLD-1, les T84, les HT29, les HCT116 et bien d'autres encore.

Les cellules T84 sont une lignée qui provient d'un carcinome de côlon. Par contre, ces cellules possèdent, en culture, la forme typique d'une cellule épithéliale intestinale (Murakami et Masui, 1980). Elles sont prolifératives jusqu'à l'atteinte de la confluence où elles formeront une monocouche de cellules polarisées possédant des microvillosités (Dharmasathaphorn et al., 1984 ; Madara et al., 1987). Des jonctions serrées (« tight junctions ») et des desmosomes ont été identifiés entre les cellules adjacentes (Dharmasathaphorn et al., 1984). Cette étude morphologique démontre bien que les cellules T84, lorsqu'elles sont cultivées en présence de sérum, possèdent la polarité structurale typique des cellules épithéliales différenciées. Les cellules T84 sont un modèle surtout utilisé pour des études sur la perméabilité paracellulaire ainsi que sur le transport électrolytique vectoriel (Madara et al., 1988).

Les cellules HT29 sont une lignée qui provient d'un adénocarcinome de côlon et ont été isolées en 1964 par Fogh & Trempe. Les cellules HT29 peuvent être indifférenciées ou différenciées dépendamment de leurs conditions de culture *in vitro*. En

effet, si les cellules HT29 sont cultivées selon les conditions standard (dans un milieu contenant du sérum), elles vont former une monocouche de cellules non polarisées, ces dernières seront très indifférenciées et ne vont donc pas développer de bordure apicale en brosse, ni de jonctions serrées avec leurs cellules adjacentes lors de l'atteinte de la confluence (Polak-Charcon et Ben-Shaul, 1979 ; Zweibaum et Chantret, 1989). Dans ces conditions, les cellules HT29 possèdent une croissance extrêmement anarchique puisqu'elles peuvent former jusqu'à 3 monocouches superposées (Marshall et al., 1977). De plus, si les cellules HT29 sont cultivées dans un milieu sans glucose (remplacement du glucose par le galactose), elles vont entamer un processus de différenciation et vont former une monocouche de cellules contenant des jonctions serrées et une bordure apicale en brosse (Fantini et al., 1986 ; Viallard et al., 1986 ; Chantret et al., 1988 ; Zweibaum et al., 1989 ; Zweibaum et Chantret, 1989). *In vivo*, les cellules HT29 ont la capacité de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris nues (Marshall et al., 1977).

Les cellules HCT116 sont une lignée qui provient d'un carcinome de côlon. Elles possèdent une forme polygonale, prolifèrent très rapidement et d'une manière très compacte (Brattain et al., 1981). *In vitro*, les cellules HCT116 ont la capacité de former des colonies lorsqu'elles sont cultivées sur agar mou, dénotant un certain potentiel tumorigénique. *In vivo*, les cellules HCT116 ont la faculté de former des tumeurs lorsqu'elles sont injectées dans des souris nues athymiques (Brattain et al., 1981).

8. Hypothèse et Objectifs

Étant donné que 1) les cellules cancéreuses peuvent acquérir des mutations au cours de la cancérogenèse qui leur confère une certaine résistance à l'apoptose/anoïkose, que 2) les bases moléculaires de cette dérégulation de l'apoptose/anoïkose dans un contexte de cancérogenèse demeurent incomprises, et que 3) la survie cellulaire et l'anoïkose sont sujettes à des mécanismes distincts de régulation selon l'état de différenciation cellulaire ; notre hypothèse est que *les cellules cancéreuses de côlon exhibent des attributs moléculaires de suppression de l'anoïkose qui s'apparentent plus aux cellules épithéliales intestinales indifférenciées que différenciées*. Les objectifs spécifiques du présent projet de recherche nous permettant de vérifier notre hypothèse sont les suivants :

- 1) Déterminer la susceptibilité à l'anoïkose (traitement en suspension) par une cinétique de DNA laddering ;
- 2) Déterminer les niveaux d'activation de kinases impliquées dans la survie entérocytaire (FAK, la voie PI3-K/Akt-1, Erk-1/Erk-2 et p38);
- 3) Déterminer l'impact de l'inhibition des différentes kinases (inhibiteurs pharmacologiques) sur la survie cellulaire et sur les niveaux d'activation des kinases ciblées;
- 4) Effectuer des transfections transitoires de constructions ADNc de FAK (formes dominantes négatives) dans le but de montrer son rôle ou non dans la survie ;

et ce, chez 3 lignées cancéreuses de côlon choisies, soient les cellules HCT116, HT29 et T84. La lignée cellulaire Caco-2/15, un modèle *in vitro* de différenciation entérocytaire humaine, sera utilisée à des fins comparatives. Les cellules HIEC seront également utilisées afin de vérifier la validité du modèle Caco-2/15 -2PC (cellules épithéliales intestinales indifférenciées).

II – MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. *Culture cellulaire*

La lignée cellulaire Caco-2/15 (Beaulieu et al., 1991 ; Vachon et al., 1992), un clone qui provient de la lignée parentale Caco-2 (Pinto et al., 1983) (HTB37; American Type Culture Collection, Rockville, MD), la lignée cellulaire HT29 (Marshall et al. 1977 ; Polak-Charcon et al., 1979 ; Zweibaum et al., 1989) (HTB38; American Type Culture Collection), dérivée d'un adénocarcinome de côlon, la lignée cellulaire T84 (Murakami et al., 1980 ; Dharmasathaphorn et al., 1984 ; Madara et al., 1987 ; Madara et al., 1988) (CCL-248; American Type Culture Collection), ainsi que la lignée cellulaire HIEC-6 (Perreault et al., 1996), représentant des cellules normales isolées de la crypte d'intestin grêle, nous ont été gracieusement données par le Dr. Jean-François Beaulieu (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc). La lignée cellulaire HCT116 (Brattain et al., 1981 ; Boyd et al., 1988) (CCL247; American Type Culture Collection), dérivée d'un adénocarcinome de côlon, nous a été généreusement donnée par la Dre Nathalie Rivard (Université de Sherbrooke). Les cellules Caco-2/15, HCT116 et HT29 ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (Gibco BRL, Burlington, Ont.) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Collect Gold, ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio), de 4 mM de glutamine (Gibco BRL), de 10 mM HEPES (Gibco BRL) et d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). Les cellules T84 ont été cultivées dans un milieu de culture ½ DMEM et ½ OPTI-MEM (Gibco BRL), supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Collect Gold, ICN Biomedicals Inc.), de 4 mM de glutamine (Gibco BRL), de 10 mM HEPES (Gibco BRL) et d'antibiotiques (100 U/ml de

pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine). Les cellules HIEC-6 ont été cultivées dans un milieu de culture DMEM (Gibco BRL), supplémenté de 5% (v/v) de sérum de veau fœtal (Cellec Gold, ICN Biomedicals Inc.), de 4 mM de glutamine (Gibco BRL), de 10 mM HEPES (Gibco BRL), d'antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine), de 0.2 U/ml d'insuline (Novo Nordisk Canada Inc., Mississauga, Ont.) et de 5 ng/ml d'EGF (BD Biosciences, Bedford, MA). Les cellules ont été incubées à 37°C sous une atmosphère humide composée de 95% d'air et de 5% de CO₂. Le milieu est changé aux 48 heures jusqu'au niveau de confluence désiré.

2. Incubation avec différents inhibiteurs pharmacologiques

Dans le but d'identifier les voies de signalisation impliquées dans la survie des différentes lignées cellulaires utilisées (HIEC-6, Caco-2/15 indifférenciées (-2 jours post-confluence (PC)) ou différenciées (30 jours PC), HCT116, HT29 et T84), nous avons utilisé différents inhibiteurs pharmacologiques inhibant des molécules et/ou des voies de signalisation connues pour promouvoir la survie chez plusieurs types cellulaires. Les différents inhibiteurs utilisés ont été ajoutés à un milieu sans sérum pré-chauffé à 37°C. La solution résultante a été vortexée (homogénéisation) avant d'être utilisée. Avant chaque traitement, les cellules ont été lavées 2 fois avec du milieu sans sérum afin d'enlever les constituants déposés provenant du sérum. Finalement, le milieu sans sérum contenant les inhibiteurs appropriés a été utilisé pour remplacer le milieu standard de culture. La durée des traitements se situait entre 0 à 48 heures.

2.1 Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

La génistéine (Sigma, Oakville, Ont.) qui est un inhibiteur à large spectre des tyrosines kinases, a été utilisée à une concentration de 300 μM (Anderson, 1997 ; Gauthier et al., 2001a ; Gauthier et al., 2001b). Nous avons de plus utilisé la cytochalasine D (Sigma), un inhibiteur affectant spécifiquement l'activation de la tyrosine kinase p125^{FAK} lorsque utilisé à une concentration de 1 μM et cela sans affecter l'organisation des filaments d'actine (Oktay et al., 1999 ; Barberis et al., 2000 ; Gauthier et al., 2001a ; Laprise et al., 2002b ; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004). Par la suite, nous avons utilisé le LY294002 (Calbiochem, San Diego, CA). Il s'agit d'un inhibiteur spécifique de la sous-unité catalytique (p110) de la PI3-kinase. Le LY294002 a été utilisé à une concentration de 30 μM puisqu'il s'agit de la concentration effective pour qu'il y ait induction d'apoptose (Vlahos et al., 1994 ; Datta et al., 1999 ; Gauthier et al., 2001a ; Laprise et al., 2002a ; Harnois et al., 2004). Ensuite, un inhibiteur sélectif des MAPK kinases MEK-1 et MEK-2, soit le PD98059 (Calbiochem) a été utilisé. Le PD98059 nous permet donc d'inhiber indirectement les MAPK p42^{Erk-2} et p44^{Erk-1} qui se retrouvent en aval des MEKs. Nous avons utilisé le PD98059 à une concentration de 20 μM (Dudley et al., 1995 ; Allesi et al., 1995 ; Le Gall et al., 2000 ; Gauthier et al., 2001 ; English et al., 2002). Finalement, le SB202190 (Calbiochem) a été utilisé. Ce dernier est un inhibiteur sélectif des MAPK p38 α et β (Young et al., 1997 ; English et al., 2002) et nous l'avons utilisé à une concentration de 20 μM , comme établi précédemment (Vachon et al., 2002, Harnois et al., 2004).

Tableau 1. Inhibiteurs pharmacologiques utilisés

Inhibiteurs	Kinases inhibées	Concentration utilisée	Source
Génisteine	TKs	300 µM	Sigma
Cytochalasine D	FAK	1 µM	Sigma
LY294002	PI-3 kinase	30 µM	Calbiochem
PD98059	MEK1-2	20 µM	Calbiochem
SB202190	MAPK p38 (α/β)	20 µM	Calbiochem

3. Mise en évidence de l'apoptose

3.1 Détection de la dégradation internucléosomique de l'ADN sur gel d'agarose

L'anoïkose peut être détectée par la dégradation internucléosomique de l'ADN en fragments caractéristiques de 200pb (une caractéristique de l'apoptose) (Nagata, 2000) sur gel d'agarose. Pour ce faire, les cellules ont été mises en état d'anoïkose pur, c'est-à-dire qu'elles ont été ensemencées sur des pétris de plastique recouverts de polyHEMA (Sigma, Oakville, Ont.) ; le polyHEMA étant un polymère qui empêche l'adhésion cellulaire (Minett et al., 1984). Le protocole utilisé est une version légèrement modifiée de la technique décrite par Chen et al. Dans la première étape de ce protocole, le milieu de culture et les cellules ont été récupérés dans un tube de 15 ml et centrifugés dans une centrifugeuse Centra CL3R (International Equipment Company (IEC), Needham Height, MA) à 1000 X g durant 5 min. Ensuite, le surnageant a été aspiré et le culot rincé

doucement avec du PBS 1X. Les cellules ont été de nouveau centrifugées selon les conditions décrites auparavant. Dans la seconde étape, 300 µl ou 600 µl de tampon de lyse (0.2% Triton X-100, 10 mM Tris, 1 mM EDTA), dépendamment du type cellulaire, ont été ajoutés aux cellules contenues dans le tube de 15 ml. Le culot a été resuspendu dans le tampon de lyse et le lysat a été transféré dans un microtube (Sarstedt) puis lysé sur glace (4°C) pendant 10 min. Le microtube a été brassé gentiment afin de resuspendre encore une fois les cellules, puis le lysat a été centrifugé à 13 000 X g pendant 15 min. à 4°C (microfugeuse Micromax ; Thermo IEC). Par la suite, le surnageant de chaque microtube a été respectivement transféré dans un nouveau microtube et a été traité à la RNase A (10 mg/ml) (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Qc) pendant 1 heure à 37°C. La concentration finale de RNase était de 60 µg/ml. La RNase ainsi que les protéines contenues dans le surnageant ont ensuite été dénaturées par une solution de 10% SDS (concentration finale de 0.5%). Les protéines ont alors été éliminées par un traitement à la protéinase K (20 mg/ml) (Promega, Madison, WI) à 50°C (Standard Heatblock ; VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Qc.) pendant 1 heure. La concentration finale de protéinase K était de 150 µg/ml. Pour terminer, 0.1 volume de NaCl 5M ainsi que 1 volume d'isopropanol (-20°C) ont été ajoutés au surnageant. Ce dernier a été incubé sur glace durant 10 min. et centrifugé à 13 000 X g pendant 15 min. à 4°C pour permettre la précipitation de l'ADN. Le surnageant a été décanté, et le culot d'ADN a été resuspendu dans 20-40 µl de TE (10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA). Les contenus en ADN des échantillons ont été mesurés par spectrophotométrie (Genesis 5 ; Milton Roy, Rochester, NY) à 260 nm et 20 µg de chaque échantillon ont été soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose (BIO-RAD, Hercules, CA) 2% contenant 0.0001% de bromure d'éthidium

(Fisher Scientific). L'électrophorèse a été effectuée à 100 V dans un tampon TBE 1X (2 mM EDTA pH 8, 89 mM Tris, 89 mM Acide Borique) qui a également été utilisé pour dissoudre l'agarose. Finalement, le gel a été photographié sous UV grâce à un transilluminateur et à une caméra digitale « Alpha Imager 1200 Documentation and Analysis System » (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA).

3.2 TUNEL *in situ*

Le TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP mediated nick end labelling) *in situ* est une autre technique permettant la détection de la dégradation de l'ADN. Cependant, cette technique possède la particularité de permettre la détection de la dégradation de l'ADN au sein de cellules individuelles (Loo et al., 1998). La technique consiste à marquer l'extrémité 3'-OH des fragments d'ADN avec un nucléotide (dUTP) couplé à un épitope telle la dioxigénine. Le nucléotide est ajouté par réaction enzymatique catalysée par la « terminal deoxynucleotidyl transferase » (TdT). Le marquage des fragments d'ADN peut finalement être visualisé au microscope à fluorescence par l'utilisation d'un anticorps anti-dioxigénine couplé à la fluorescéine isothiocyanate (FITC). Le TUNEL *in situ* a été effectué selon une version modifiée du protocole fournit avec le « ApopTag fluorescein *in situ* detection kit » (Chemicon International Inc., Temecula, CA). Pour cette expérience, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre de 12 mm (Fisher Scientific) recouvertes d'une solution 0.1% (w/v) de Poly-L-Lysine (Sigma). Premièrement, les cellules ont été fixées dans une solution de 2 % formaldéhyde/tampon phosphate (0.2 M Na₂HPO₄ pH 7.4) pendant 45 min. à 4°C.

La fixation se déroulait directement dans le puit de la plaque à 12 puits (Falcon) dans laquelle les cellules ont été cultivées. Les lamelles ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS 1X pendant 5 min. La réaction de fixation a ensuite été arrêtée (« quenching ») par l'ajout d'une solution de PBS-glycine (150 mM pH 7.2) pendant 15 min. à T°P, suivie de 2 autres lavages au PBS 1X pendant 5 min. Les cellules ont ensuite été perméabilisées avec une solution de 0.1% PBS-Triton-X-100 fraîche pendant 3 min. à T°P, puis lavées 2 fois au PBS (5 min.). Les sites non spécifiques ont ensuite été bloqués avec une solution de Blotto 10% avec azide « centrifugée », puis les lamelles ont été chacune transférées dans un autre puit et équilibrées (tampon d'équilibration) 5 min. à T°P. La réaction a alors été amorcée par l'ajout de la solution enzymatique (TdT diluée 2.4 fois dans le tampon de réaction) à 37°C pour 1 heure. La réaction se terminait par l'incubation des lamelles dans le tampon d'arrêt (dilution 1/34 dans l'eau) pendant 10 min. à T°P. Suite à 2 lavages de 5 min. dans du PBS, les lamelles ont été bloquées pendant 15 min. à T°P dans une solution de Blotto 10% avec azide « centrifugée », puis incubées avec l'anticorps anti-dioxigénine couplée à la fluorescéine (diluée 2.13 fois dans la solution de blocage) pour une période de 45 min. à T°P dans une chambre humide. Les lamelles ont alors été lavées à 2 reprises dans du PBS, colorées dans une solution de 0.01% de bleu d'Evans (Sigma) pendant 30 secondes ou dans une solution de DAPI (dilution 1/50 000 d'une solution 10 mg/ml) pendant 5 min. puis soumises à nouveau à 2 lavages de 10 min. toujours dans du PBS. Finalement, les lamelles ont été montées dans une solution de glycérol-PBS 9 : 1 contenant 0.1% de paraphénylène diamine (Sigma) puis observées à l'aide d'un microscope Leica DM-RxA (Leica, St-Laurent, Qc). Les comptes de cellules apoptotiques et de cellules totales ont été évalués (5 champs visuels différents par

lamelle). Les pourcentages de cellules apoptotiques ont ensuite été compilés ([nombre de cellules apoptotiques/nombre de cellules totales] X 100%). Finalement, les index relatifs d'apoptose ont été évalués ([% de cellules apoptotiques du traitement pharmacologique / % de cellules apoptotiques si Ctrl SS] X 100%) (% du contrôle). Chaque résultat représente la moyenne \pm SEM (« standard error on mean ») pour chaque type cellulaire pour au moins 3 expériences distinctes ($n \geq 3$).

3.3 Transfection des cellules T84 avec des constructions ADNc de $p125^{FAK}$ (WT, $p45^{FRNK}$ et Y397F).

Afin de déterminer si la protéine $p125^{FAK}$ est importante ou joue un rôle dans la survie des cellules T84, nous avons procédé à plusieurs transfections avec diverses constructions ADNc de FAK. Nous avons donc utilisé une construction de la forme sauvage de la protéine $p125^{FAK}$ (WT) comme contrôle. Nous avons également utilisé deux constructions mutantes, soient la forme dominante négative naturelle ($p45^{FRNK}$) et une construction kinase inactive (Y397F). Toutes les constructions sont clonées dans le vecteur d'expression myc-pCMV. Les diverses constructions de FAK nous ont été généreusement données par J.T. Parsons (Health Science Center, University of Virginia, Charlottesville, VA). Pour cette expérience, les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre de 12 mm (Fisher Scientific) recouvertes d'une solution 0.1% (w/v) de Poly-L-Lysine (Sigma). Les cellules ont ensuite été transfectées avec 5 μ g d'ADN par lipofection (Vachon et al., 1996) lorsqu'elles avaient atteint la confluence.

Dans un microtube de 1.5 ml (Sarstedt), 5 µg de vecteur ont été ajoutés à 200 µl de milieu ne contenant ni sérum ni antibiotiques (milieu de transfection). De façon concomitante, 15.6 µg de lipofectamine (Gibco BRL) ont été ajoutés à 125 µl de milieu de transfection dans un autre microtube de 1.5 ml. Le contenu des deux tubes a alors été mélangé puis incubé pendant 45 minutes à T°P avec agitations occasionnelles. À la fin de l'incubation, les cellules ont été lavées à deux reprises avec du milieu de transfection. Par la suite, nous avons ajouté 160 µl de milieu de transfection à chaque tube. La solution résultante (volume final d'environ 500 µl) a été ajoutée à la culture cellulaire. Suite à une incubation de 5 heures à 37°C (conditions usuelles), 500 µl de milieu de transfection supplémenté de 20% de sérum ont été ajoutés à chaque puit puis l'incubation s'est poursuivie pour une période de 24 heures. Le milieu a ensuite été remplacé par du milieu de culture frais standard (10% de sérum + antibiotiques) pour 24 heures. Finalement, les cellules ont été incubées 24 heures dans un milieu sans sérum (+ antibiotiques) avant de procéder au TUNEL *in situ*. Les comptes ont été établis comme précédemment (voir section 3.2).

4. ANALYSE IMMUNOPRÉCIPITATION/WESTERN BLOT

4.1 Solubilisation des protéines pour Western Blot

Une fois le milieu de culture enlevé, les cellules (pétri de 100 mm) ont été lavées à deux reprises avec du PBS 1X. Ensuite, 350 µl (cellules sous-confluentes) ou 700 µl (cellules confluentes) de tampon de solubilisation Laemmli (125 mM Tris-HCl pH 6.8,

0.23% de SDS, 10% de glycérol, 0.005% de bleu de bromophénol (Sigma) et 5% de β -mercaptoéthanol (BIO-RAD)) ont été ajoutés pour chaque pétri de 100 mm. Les échantillons ont été récupérés dans un microtube, soniqués sur glace (Ultrasonic processor ; Mandel Scientific, St-Laurent, Qc) pendant 10 secondes puis chauffés à 100  C (Standard Heatblock ; VWR Canlab, Ville Mont-Royal, Qc) pendant 5 minutes. Finalement, les débris cellulaires restants ont été éliminés suite à une centrifugation de 5 min.    15 000 rpm (microcentrifugeuse Micromax ; IEC) et les surnageants ont été conservés à -80  C.

4.2 Solubilisation des protéines pour immunoprécipitation

Une fois le milieu de culture enlevé, les cellules (pétri de 100 mm) ont été lavées à deux reprises avec du PBS 1X. Ensuite, 250 μ l (cellules sous-confluentes) ou 1 ml (cellules confluentes) de tampon de solubilisation RIPA (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% Na Acide D  oxicholate et 0.1% SDS) contenant un cocktail d'inhibiteurs de phosphatases (100 μ M Na Vanadate, 1 mM PMSF/Isopropanol, 0.5 μ g/ml de Leupeptine, 0.5 μ g/ml d'Aprotinine, 0.7 μ g/ml de Pestatine, 40 mM de β -Glycérophosphate et 10 mM de p-NPP). Les échantillons ont été récupérés dans un microtube, lysés sur glace pendant 30 min. en vortexant aux 5 min. Les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation de 5 min.    15 000 rpm (microfugeuse Micromax ; Thermo IEC)    4  C. Les surnageants ont été conservés à -80  C.

4.3 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS-PAGE)

Suite au dosage selon la méthode modifiée de Lowry (Peterson G.L., 1977), 50 µg de protéines ont été prélevés pour chaque échantillon, puis ont été chauffés à 100°C durant 5 min. et centrifugés avant d'être séparés sur un gel de polyacrylamide dénaturant 4-15 ou 7.5% (Ready gel Tris; BIO-RAD). Un marqueur de poids moléculaire coloré a également été déposé sur le gel (7.2-212 kD Broad Range; BIO-RAD ou Full range Rainbow, Amersham Biosciences). L'électrophorèse a été effectuée à 100 volts dans un tampon composé de 25 mM Tris, 0.1% SDS et 192 mM glycine. Lorsque la migration est complétée, les protéines ont été soumises à un électrotransfert liquide (100V, 1-1^{1/4} heure) sur une membrane de nitrocellulose (Amersham Life Science, Piscataway, NJ) pré-incubée dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine et 20% méthanol). L'efficacité du transfert a été vérifiée par une coloration de la membrane au rouge de Ponceau (Sigma) 0.2%. Les membranes ont ensuite été décolorées dans du PBS 1X contenant 0.05% de tween-20 (BIO-RAD).

4.4 Immunodétection des protéines (Western Blot)

Les membranes ont d'abord été saturées en protéines (blocage) grâce à une incubation durant toute la nuit (O/N) dans une solution de lait écrémé en poudre 10% (blotto) ou dans une solution de BSA 2% dissoutes toutes les deux dans le PBS/tween-20 0.05%. Les membranes ont ensuite été incubées, selon l'anticorps utilisé (voir section 4.6), dans la solution d'anticorps primaire (diluée dans la même solution qu'utilisée pour

le blocage), pour une période de 16 heures à 4°C, ou soit pour des périodes variant de 1 à 2 heures à T°P. Ensuite, les membranes ont été soumises à 4 lavages de 10 minutes sous agitation dans une solution de PBS-tween-20 0.05%. Cette étape a été suivie d'une incubation de 1 heure à la T°P avec une solution de blotto 10% afin de bloquer les sites non spécifiques qui n'ont pas été occupés par l'anticorps primaire. Les membranes ont alors été lavées 2 fois sous agitation durant 5 min. dans une solution de PBS/tween-20 0.05%. Par la suite, les membranes ont été incubées 1 heure à T°P avec la solution d'anticorps secondaire (voir section 4.6.1) couplés à la peroxydase diluée dans le blotto 10%. Les membranes ont ensuite été lavées 2 fois avec la solution de PBS/tween-20 0.05% et 2 fois avec du PBS 1X seul, pour des périodes de 10 min. Les bandes immunoréactives ont finalement été révélées par l'ajout de la solution ECL (Amersham Life Science, Piscataway, NJ), suivi d'une exposition des films « Hyper Film ECL » (Amersham Life Science).

4.5 Immunoprécipitation

La première étape consiste à laver les billes d'agarose qui étaient contenues dans un tampon salin. Nous utilisons environ 50 µl de billes par échantillons qui sont lavées à 3 reprises avec 500 µl de tampon RIPA non complet (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% Na Acide Désoxicholate et 0.1% SDS). Pour le reste de l'expérience, il faut noter que le tampon RIPA utilisé est complet, donc il contient les composantes de base (décrites ci-haut) et le cocktail d'inhibiteurs (100 µM Na Vanadate, 1 mM PMSF/Isopropanol, 0.5 µg/ml de Leupeptine,

0.5 µg/ml d'Aprotinine, 0.7 µg/ml de Pestatine, 40 mM de β-Glycérophosphate et 10 mM de p-NPP). Par la suite, il faut procéder à la liaison des billes avec l'anticorps qui reconnaîtra la protéine que nous désirons immunoprécipiter. Nous ajoutons donc 300 µl de tampon RIPA aux billes lavées ainsi que 1-4 µg d'anticorps (voir section 4.6). Les échantillons ont alors été agités pendant 2 heures à T°P (Gyrotwister Shaker GX-1000, Labnet International Inc., Woodbridge, NJ). Les microtubes ont ensuite été centrifugés à 15 000 rpm, et les billes ont été lavées 2 fois avec 300 µl de tampon RIPA. Finalement, il faut procéder à la liaison de l'antigène (IgG) avec le complexe billes-anticorps. Le complexe billes-anticorps a alors été mis en contact avec 500 µl de lysat pour chaque échantillon, et les microtubes ont été mis sous agitation à 4°C pendant 4 heures. Les microtubes ont ensuite été centrifugés à 15 000 rpm, et les lysats ont été récupérés dans le stock original. Les billes ont alors été lavées 3 fois avec du RIPA et ont été conservées dans 100 µl de tampon Laemmli, puis chauffées 5 min. à 100°C pour permettre la solubilisation de la protéine immunoprécipitée. Les microtubes ont donc été centrifugés à 15 000 rpm pendant 5 min. puis conservés à -80°C.

4.6 Anticorps primaires utilisés

4.6.1 Anticorps détectant la protéine FAK.

Nous avons utilisé un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la forme active de FAK qui reconnaît la phosphorylation sur la tyrosine 397 (Phospho-Fak (Tyr397)) (Ab 07-012, Upstate Biotechnology). Nous avons également utilisé un anticorps monoclonal

de souris dirigé contre la protéine p125^{FAK}, le clone 4.47 (mAB 05-537, Upstate Biotechnology).

4.6.2 Anticorps détectant la protéine Akt-1.

Nous avons utilisé deux anticorps polyclonaux de lapin afin de détecter la protéine Akt-1 : un dirigé contre la forme active d'Akt-1 qui reconnaît la phosphorylation sur la sérine 473 (Phospho-Akt-1 (Ser473)) (Ab 9271, Cell Signaling), et un autre qui reconnaît la protéine p57^{Akt-1} (Ab 07-416, Upstate Biotechnology).

4.6.3 Anticorps détectant les protéines p44/42 MAP Kinase.

Nous avons utilisé deux anticorps polyclonaux de lapin afin de détecter les protéines p44/42 MAP Kinase : un dirigé contre la forme active des p44/42 MAP Kinase qui reconnaît les phosphorylations sur la tyrosine 204 et sur la thréonine 202 (Phospho-p44/p42 MAPK (Tyr204/Thr202)) (Ab 9101, Cell Signaling), et un autre qui reconnaît les protéines p44^{Erk-1}/p42^{Erk-2} MAP Kinase (Ab 9102, Cell Signaling).

4.6.4 Anticorps détectant la protéine p38.

Nous avons utilisé deux anticorps polyclonaux de lapin afin de détecter la protéine p38 : un dirigé contre la forme active de p38 α/β qui reconnaît les phosphorylation sur la thréonine 180 et la tyrosine 182 (Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)) (Ab 9211, Cell

Signaling), et un autre qui reconnaît la protéine p38 totale (p38 MAPK) (Ab 9212, Cell Signaling).

4.6.5 Anticorps détectant l'actine.

Nous avons finalement utilisé un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'actine (MAB 15014, Chemicon) , ce qui nous permet de détecter les niveaux totaux de protéines.

Tableau 2. Anticorps de voies de signalisation utilisés pour les analyses Western Blot.

Anticorps Primaires					
Anticorps	Type	Protéine reconnue	Espèce	Dilution	Source
Ab 05-537	Monoclonal	p125 ^{FAK}	Humain, Souris, Rat	1/1000	Upstate Biotechnology
Ab 07-012	Polyclonal	pp125 ^{FAK} (Tyr397)	Humain, Souris, Rat	1/1500	Upstate Biotechnology
Ab 07-416	Polyclonal	p57 ^{Akt-1}	Humain, Souris, Rat	1/1000	Upstate Biotechnology
Ab 9271	Polyclonal	pp57 ^{Akt-1} (Ser473)	Humain, Souris, Rat, Hamster, Poulet	1/250	Cell Signaling
Ab 9102	Polyclonal	p44/p42	Humain, Souris, Rat, Hamster	1/500	Cell Signaling
Ab 9101	Polyclonal	pp44/p42 (Tyr204/Thr202)	Humain, Souris, Rat, Hamster, Poulet	1/500	Cell Signaling
Ab 9212	Polyclonal	p38	Humain, Souris, Rat	1/1000	Cell Signaling
Ab 9211	Polyclonal	pp38 (Thr180/Tyr182)	Humain, Souris, Rat	1/500	Cell Signaling
MAB 1501	Monoclonal	Actine	Toutes les espèces	1/10 000	Chemicon

4.7 Anticorps secondaires utilisés

Nous avons utilisés les anticorps secondaires couplés à la peroxydase dirigés contre les IgG de lapin (Ab 7074, Cell Signaling) et dirigés contre les IgG de souris (A-2554, Sigma).

4.8 Déshybridation des membranes

Pour certaines expériences d'analyse en Western Blot, les membranes ont été déshybridées, suite à une première utilisation, par une incubation de 20 min. à T°P dans une solution de 100 mM glycine, 1% tween-20 pH 2.9. Par la suite, les membranes ont été lavées 3 fois durant 5 min. avec du PBS. Le Western Blot subséquent a ensuite débuté par l'étape du blocage (précédent l'incubation avec l'anticorps primaire).

4.9 Analyses densitométriques et statistiques

Puisque la réponse des films aux photons est non linéaire, les bandes ont été estimées par densitométrie. Les films ont d'abord été scannés (UMAX Astra 2400S), et la densitométrie des bandes a pu être analysée grâce au programme Scion Image (Scion Corporation). L'aire sous la courbe a été évaluée pour chaque bande. Pour chaque traitement, les niveaux d'activation relatifs des molécules analysées ont été évalués par rapport à ceux des cultures contrôles en vue d'établir le ratio traitement/contrôle x 100 (étant exprimé comme le « % du contrôle »). Les données obtenues représentent la

moyenne \pm SEM de 3 expériences i.e. 3 séries d'échantillons distincts ($n \geq 3$). L'erreur sur les valeurs est le SEM (« Standard Error on Mean »). Les différences statistiquement significatives ont été obtenues pour un intervalle de confiance de 95% ($0.001 \leq p \leq 0.5$) grâce au « Student t Test » performé avec le programme Sigma Stat.

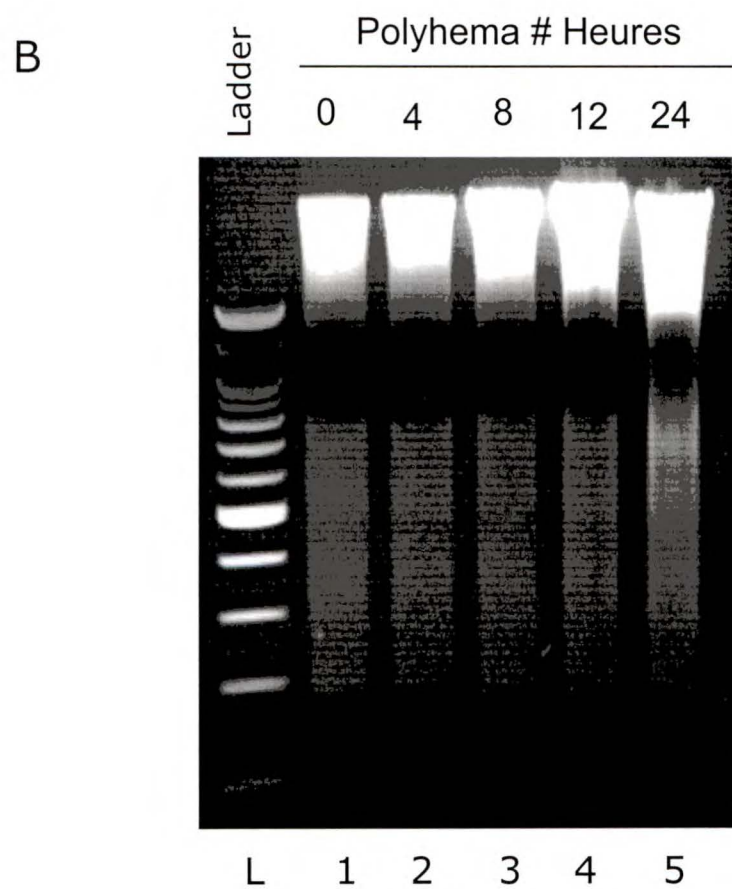
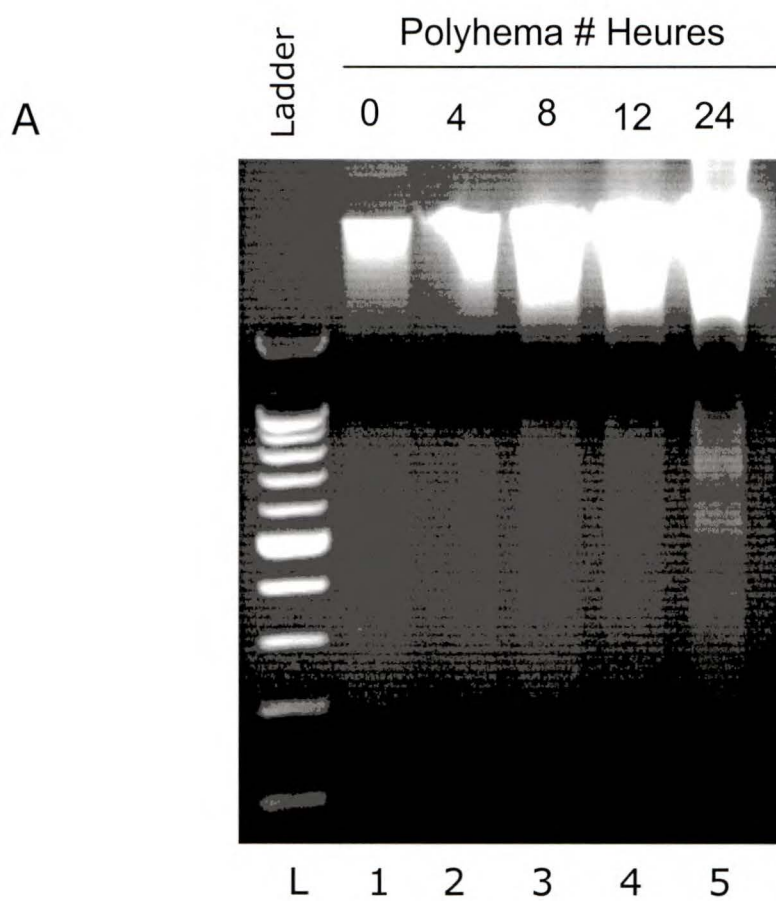
III – RÉSULTATS

1. *L'anoïkose entérocytaire*

1.1 *L'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées*

Nous avons vérifié la susceptibilité à l'anoïkose, c'est-à-dire la perte d'adhésion cellulaire, chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les cellules ont subi un traitement sur polyHEMA (-2PC) ou un traitement en suspension (30PC) dans un milieu sans sérum pendant divers temps, soient 0, 4, 8, 12 et 24 heures, ce qui nous a permis d'établir une cinétique. La dégradation internucléosomique de l'ADN en fragments de 200 pb a pu être détectée par la méthode de DNA laddering. Tel qu'attendu (Gauthier et al., 2001a), nous observons que : 1) l'intensité de la fragmentation augmente graduellement de 0 à 24 heures chez les cellules indifférenciées (figure 7A, lignes 1 à 5) ; et 2) les cellules Caco-2/15 30PC présentent déjà une certaine fragmentation d'ADN à 0 heures (figure 7B, ligne 1), démontrant une plus grande sensibilité à l'absence de sérum ; par la suite, ce taux de fragmentation demeure stable jusqu'à 8 heures de traitement en suspension (figure 7B, ligne 3) ; et finalement, l'intensité de la fragmentation d'ADN augmente graduellement de 8 à 12 heures et de 12 à 24 heures de traitement en suspension (figure 7B, lignes 3 à 5). Ces observations supportent la preuve que les cellules épithéliales intestinales différenciées sont plus susceptibles à l'anoïkose que les cellules indifférenciées (Gauthier et al., 2001a).

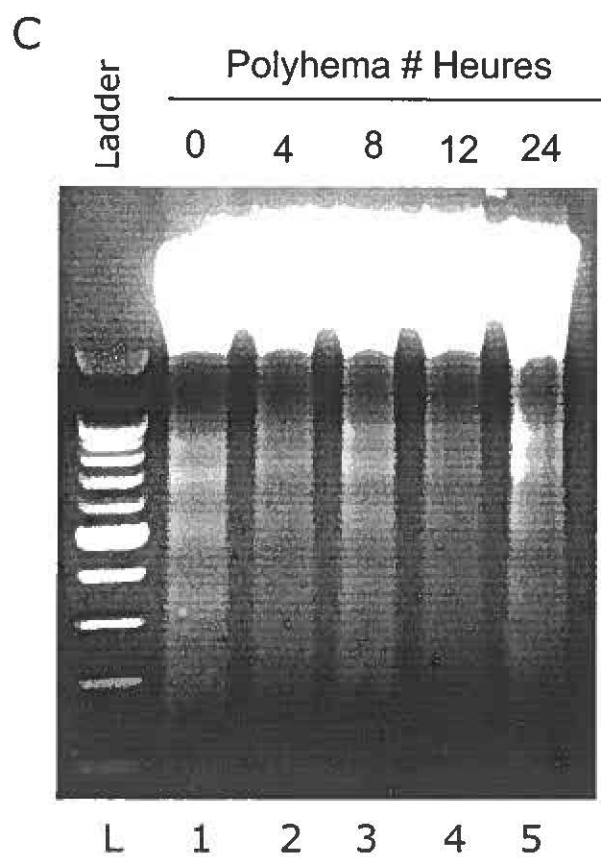
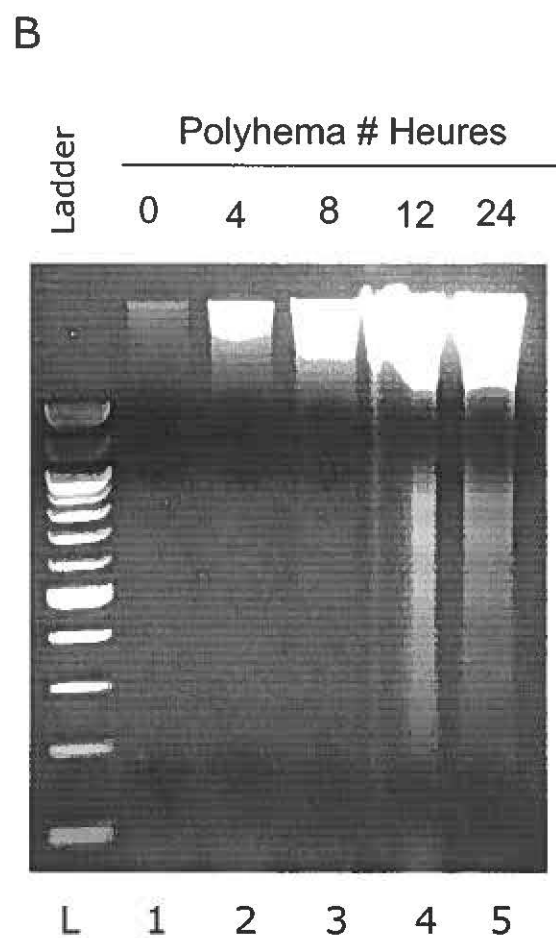
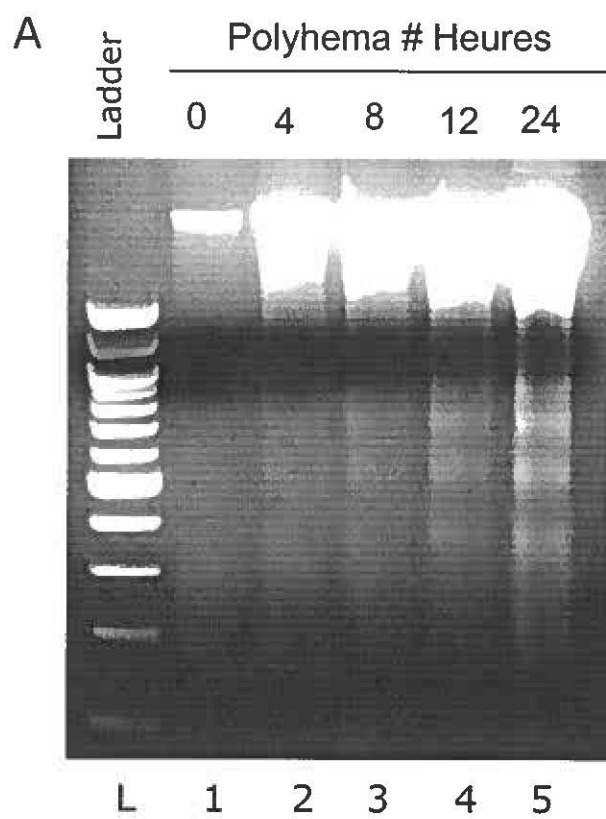
Figure 7. Susceptibilité différentielle à l'anoïkose des cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées. A et B : Essais représentatifs de cinétiques de DNA laddering de cultures de cellules Caco-2/15 A) indifférenciées (-2 jour post-confluence) ; et B) différenciées (30 jours post-confluence). Les cellules ont subi un traitement sur polyhema (-2PC) ou un traitement en suspension (30PC) dans un milieu sans sérum pendant 0 heure (ligne 1), 4 heures (ligne 2), 8 heures (ligne 3), 12 heures (ligne 4) ou 24 heures (ligne 5). Les ADNs (20 μ g/ligne) ont été isolés des cultures traitées, ont été séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose et ensuite, colorés au bromure d'éthidium pour la visualisation de la fragmentation de l'ADN internucléosomique associée à l'apoptose/anoïkose. L, marqueur d'ADN de 100-pb.



1.2 L'anoïkose chez différentes lignées de cancer colorectal.

Ensuite, nous avons vérifié la susceptibilité à l'anoïkose de différentes lignées de cancer colorectal, soient les cellules HCT116, HT29 et T84. Les cellules ont subi un traitement sur polyHEMA dans un milieu sans sérum pendant divers temps, soient 0, 4, 8, 12 et 24 heures, ce qui nous a permis d'établir une cinétique. La dégradation internucléosomique de l'ADN a pu être détectée par la méthode de DNA laddering. Nous observons que : 1) l'intensité de la fragmentation augmente graduellement de 0 à 24 heures chez les cellules HCT116 (figure 8A, lignes 1 à 5) ; 2) chez les cellules HT29, une très faible fragmentation débute après 4 heures (figure 8B, ligne 2) et son intensité demeure stable jusqu'à 8 heures (figure 8B, ligne 3) et finalement, elle augmente après 12 et 24 heures (figure 8B, lignes 4 et 5) ; et 3) chez les cellules T84, une forte fragmentation est présente à 0 heure (figure 8C, ligne 1), suivie d'une baisse à 4 heures (figure 8C, ligne 2), puis d'une hausse à 8 heures (figure 8C, ligne 3); finalement, une baisse est observée à 12 heures (figure 8C, ligne 4) suivie d'une nouvelle hausse après 24 heures (figure 8C, ligne 5). Ces observations suggèrent que les cellules HCT116 auraient une sensibilité à l'anoïkose semblable à celle des cellules épithéliales intestinales indifférenciées ; les cellules HT29 sembleraient plus résistantes à l'anoïkose que les cellules indifférenciées et différenciées, alors que la susceptibilité à l'anoïkose des cellules T84 semblerait s'apparenter à celle des cellules différenciées.

Figure 8. Susceptibilités distinctes à l'anoïkose des cellules cancéreuses de côlon HCT116, HT29 et T84. A, B et C : Essais représentatifs de cinétiques de DNA laddering de cultures de cellules A) HCT116 ; B) HT29 ; et C) T84. Les cellules cancéreuses de côlon ont subi un traitement sur polyhema dans un milieu sans sérum pendant 0 heure (ligne 1), 4 heures (ligne 2), 8 heures (ligne 3), 12 heures (ligne 4) ou 24 heures (ligne 5). Les ADNs (20 μ g/ligne) ont été isolés des cultures traitées, ont été séparés par une électrophorèse sur gel d'agarose et ensuite, colorés au bromure d'éthidium pour la visualisation de la fragmentation de l'ADN internucléosomique associée à l'apoptose/anoïkose. L, marqueur d'ADN de 100-pb.



2. Kinase d'adhésion focalisée (p125^{FAK}) et Survie cellulaire.

2.1 Niveaux d'expression et d'activation de base de FAK chez différentes lignées de cancer colorectal.

Dans un premier temps, nous avons analysé par Western Blot les niveaux d'expression et d'activation de base de la kinase FAK chez différentes lignées de cancer colorectal, soient les cellules HCT116, HT29 et T84. Ceci a été fait dans le but de comparer ces niveaux avec ceux observés chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Tel que résumé à la figure 9, nous observons que : 1) les niveaux d'expression de FAK sont plus élevés chez les cellules différenciées (figures 9A et 9B), alors que les niveaux d'activation de FAK sont plus élevés chez les cellules indifférenciées (figures 9C et 9D) ; 2) les niveaux d'expression et d'activation de FAK chez les cellules HCT116 s'apparentent à ceux des cellules différenciées (figures 9B et 9D) ; 3) les niveaux d'expression et d'activation de FAK chez les cellules HT29 s'apparentent également à ceux des cellules différenciées (figures 9B et 9D) et 4) les niveaux d'expression et d'activation de FAK chez les cellules T84 s'apparentent à ceux des cellules indifférenciées (figures 9B et 9D). Ces observations indiquent que les niveaux d'expression et d'activation de base de FAK chez nos différentes lignées de cancer colorectal ne correspondent pas à leur degré de dédifférenciation, puisque chez nos cellules cancéreuses qui ne se différencient/polarisent pas (HCT116, HT29), ces niveaux sont semblables à ceux des cellules épithéliales intestinales différenciées, alors que chez

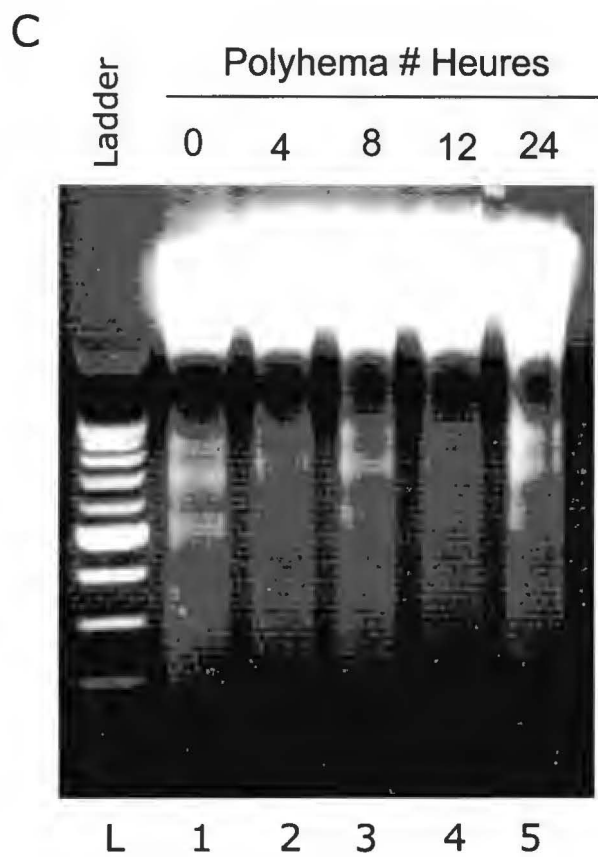
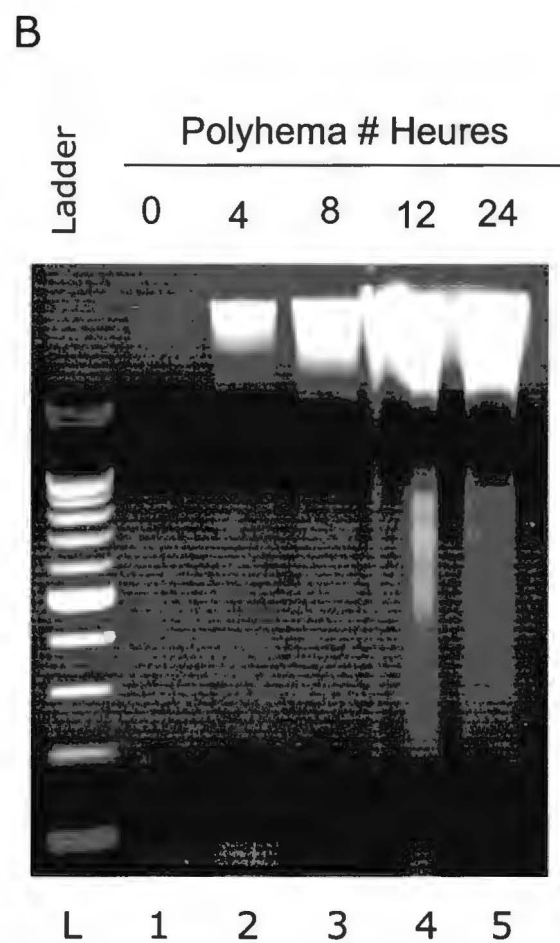
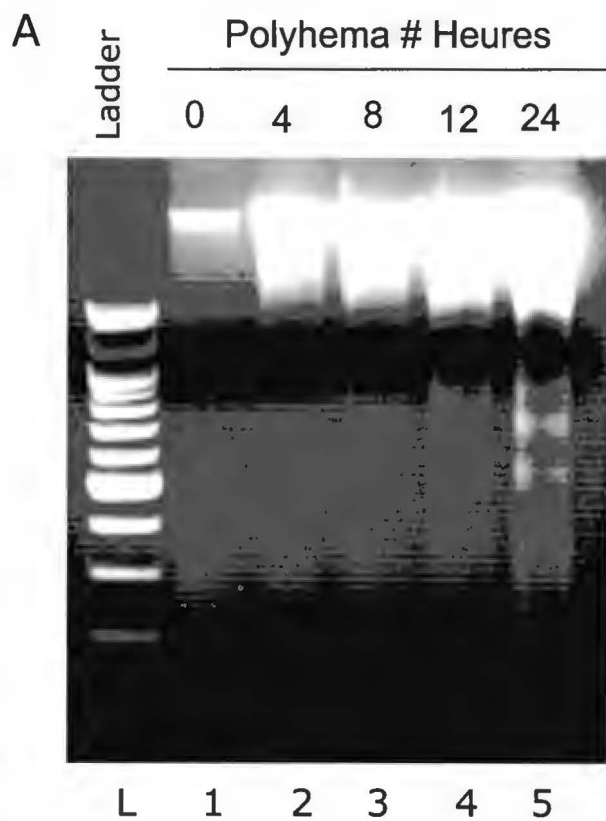
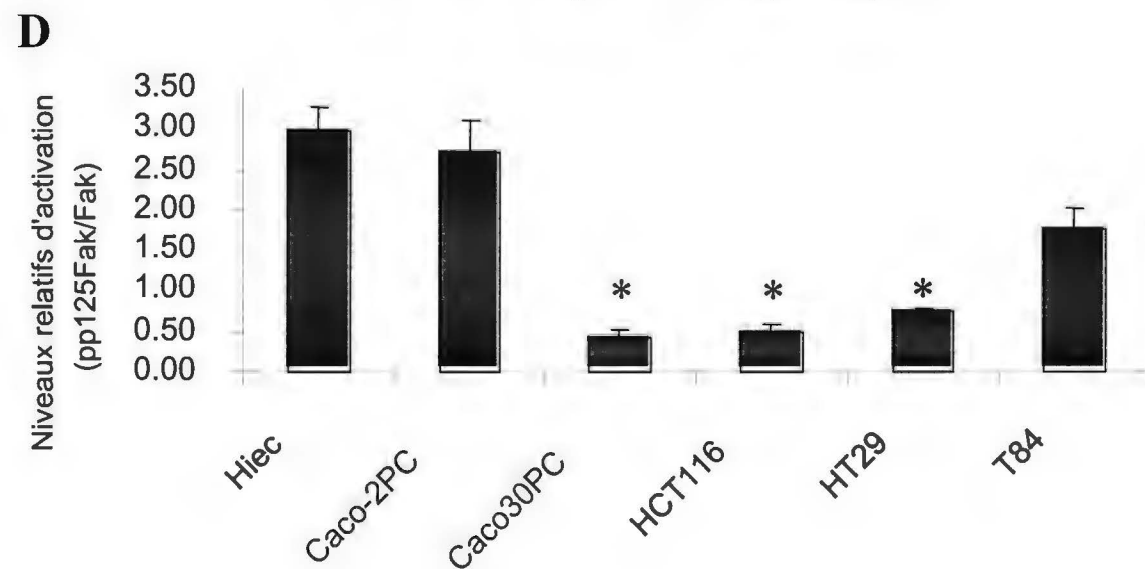
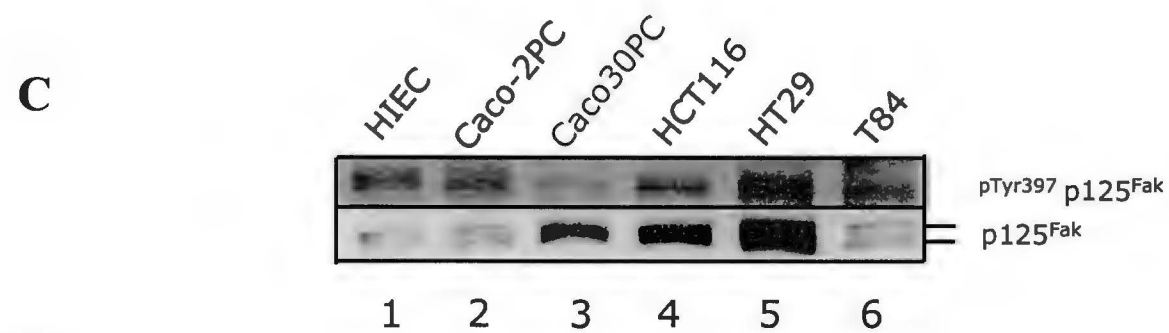
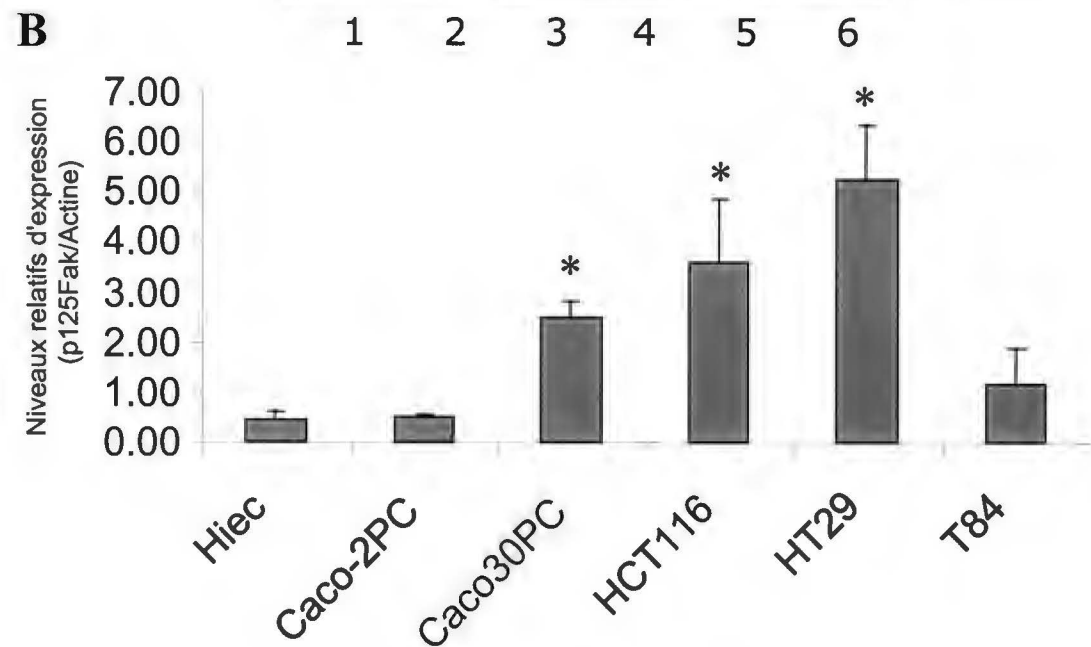
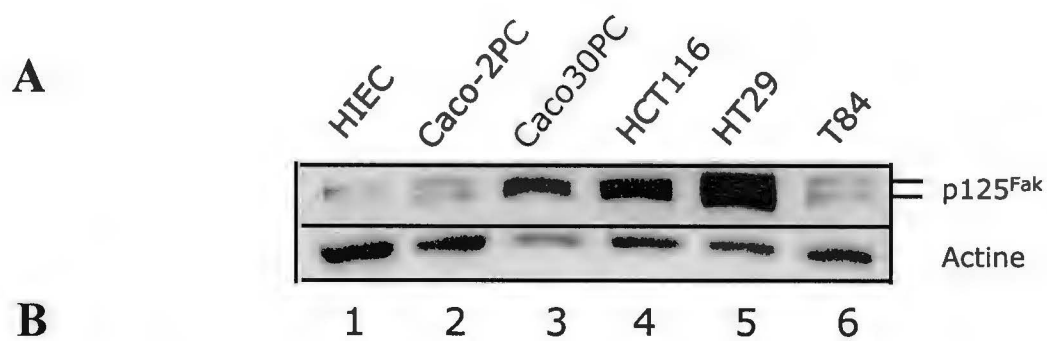


Figure 9. Les niveaux d'expression et d'activation de base de FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal ne correspondent pas à leur degré de dédifférenciation. A : Analyse Western Blot représentative de l'expression de p125^{FAK} chez les cellules HIEC (ligne 1), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (ligne 2) et différenciées (30PC) (ligne 3), et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon ; les cellules HCT116 (ligne 4), HT29 (ligne 5) et T84 (ligne 6). Les protéines totales (50 µg/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour la protéine FAK. La détection de l'actine a aussi été analysée pour des raisons de normalisation. B : Niveaux relatifs d'expression de FAK chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'expression de FAK ont été déterminés par le ratio de p125^{FAK}/Actine. C : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p125^{FAK} chez les différentes lignées utilisées en A. Les protéines totales ont été séparées comme représenté en A et ont été détectées avec des anticorps spécifiques de la forme activée de FAK (pp125^{FAK}), phospho-Tyr-397, et de la protéine FAK (p125^{FAK}). D : Niveaux relatifs d'activation de FAK chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été déterminés par le ratio de pp125^{FAK}/p125^{FAK}. Les données représentent la moyenne ± SEM pour au moins 3 (n ≥ 3) cultures séparées et indépendantes pour chaque lignée cellulaire analysée. * Différence statistiquement significative (p ≤ 0.05) en comparaison aux Caco-2/15 -2PC.



nos cellules cancéreuses qui se polarisent (T84), ces niveaux sont semblables à ceux des cellules épithéliales intestinales indifférenciées.

2.2 Impact de l'inhibition de la kinase FAK sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal.

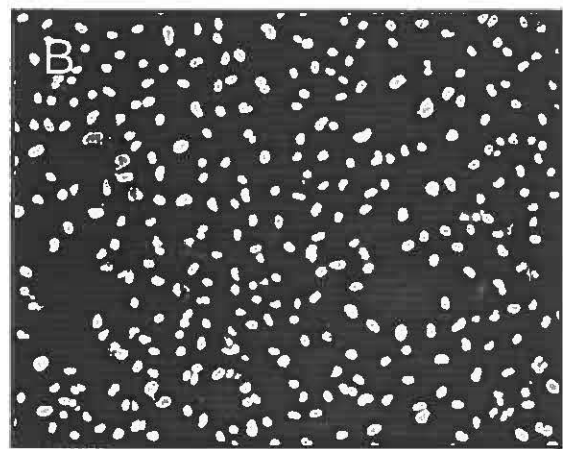
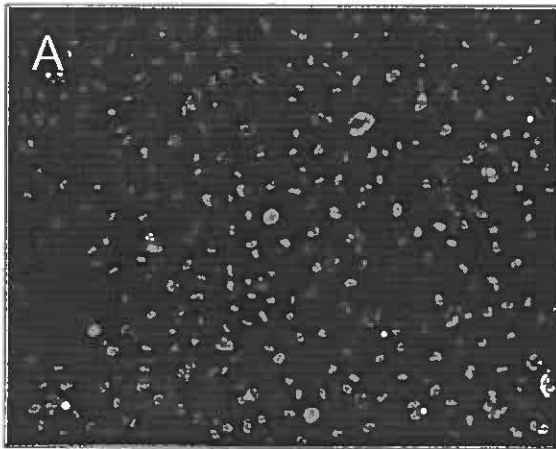
Nous avons vérifié l'impact de l'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D (1 μ M) sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal utilisées (HCT116, HT29 et T84). À des fins de comparaison, cela a également été vérifié chez des cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et des cellules différenciées (Caco-2/15 30PC). Un traitement à la génistéine (300 μ M) a aussi été utilisé à titre de contrôle positif d'apoptose. L'induction de l'apoptose a été visualisée par TUNEL *in situ*. Nous observons que : 1) l'absence de sérum n'induit pas l'apoptose chez la plupart de nos types cellulaires, excepté chez nos cellules T84 qui semblent être plus sensibles à l'absence de sérum (figures 10A+B, 11A+B, 12A+B, 13A+B, 14A+B, 15A+B) ; 2) le traitement à la génistéine, comme nous nous y attendions (Gauthier et al., 2001a), induit fortement l'apoptose chez tous les types cellulaires utilisés (figures 10C+D, 11C+D, 12C+D, 13C+D, 14C+D, 15C+D) ; 3) la présence de cytochalasine D induit l'anoïkose tant chez les cellules indifférenciées que différenciées (figures 10E+F, 11E+F, 12E+F et 16) et 4) la cytochalasine D induit également l'anoïkose chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84, où nous ne retrouvons aucune différence statistiquement significative comparativement au contrôle sans sérum (figures 13E+F, 14E+F, 15E+F et 16). Ces résultats indiquent que les cellules HCT116 et HT29 (qui ne se

Figure 10. Les cellules HIEC sont sensibles à l'inhibition de la kinase FAK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D (+CD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 10X.

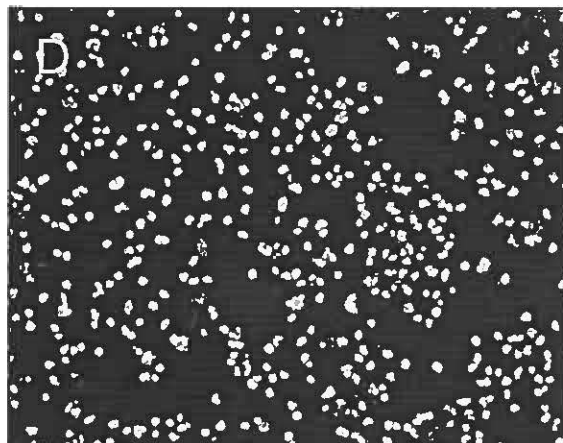
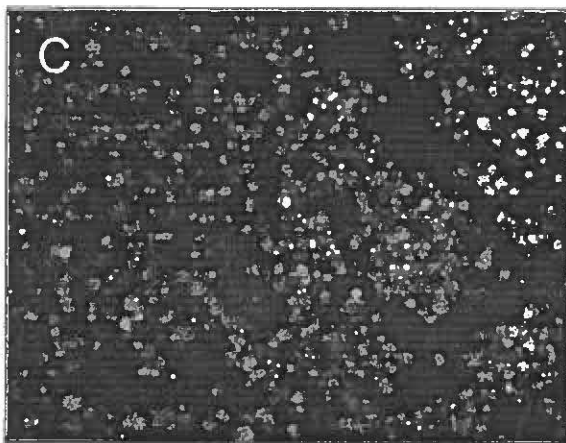
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+CD

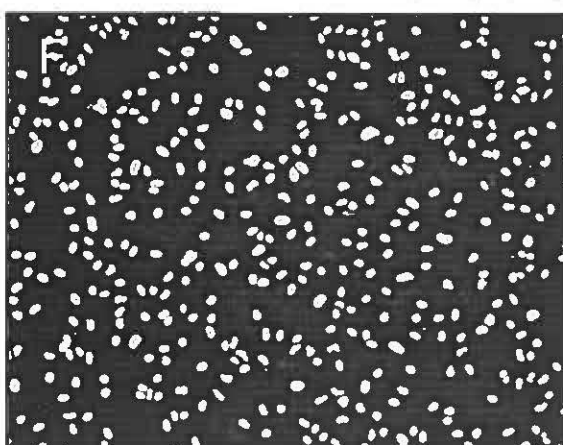
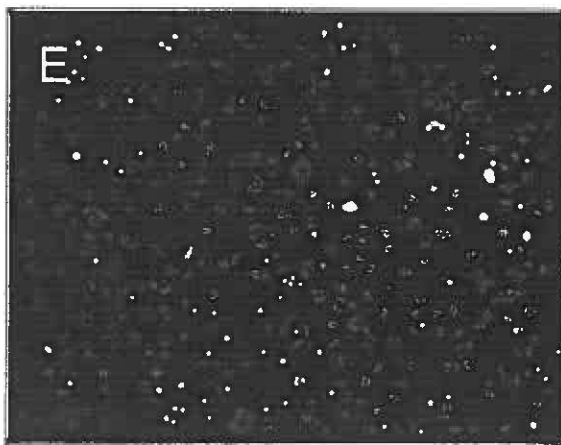
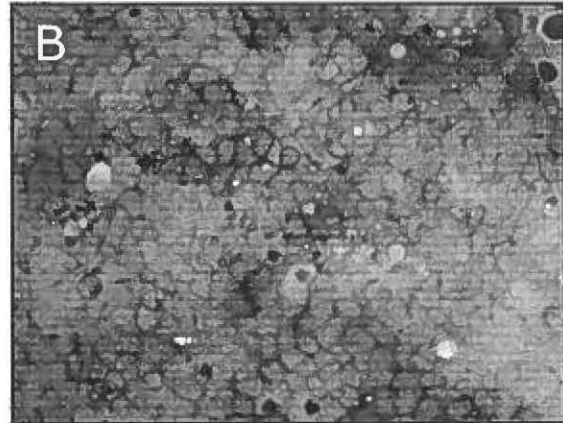
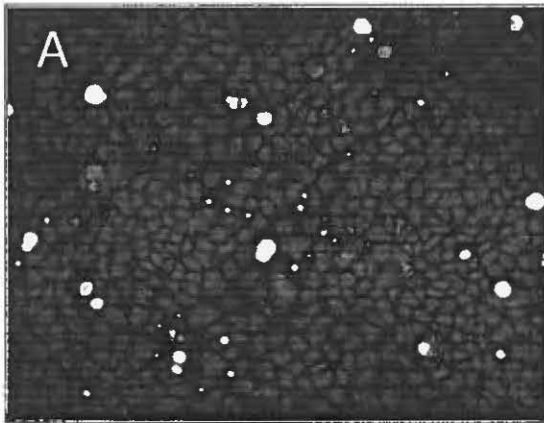


Figure 11. Les cellules Caco-2PC sont sensibles à l'inhibition de la kinase FAK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 - 2PC (sous confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D (+CD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

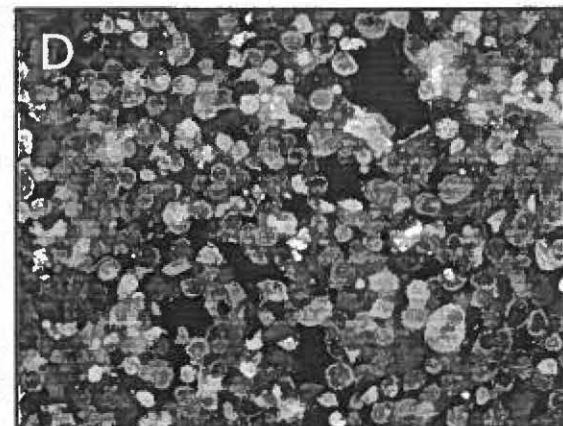
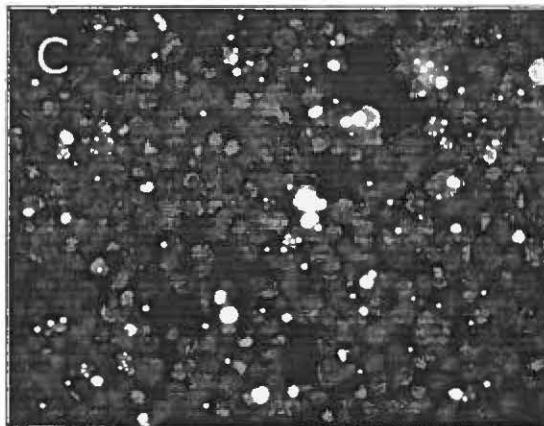
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+CD

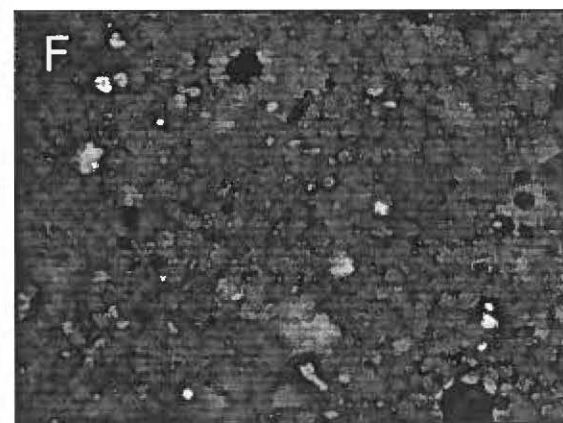
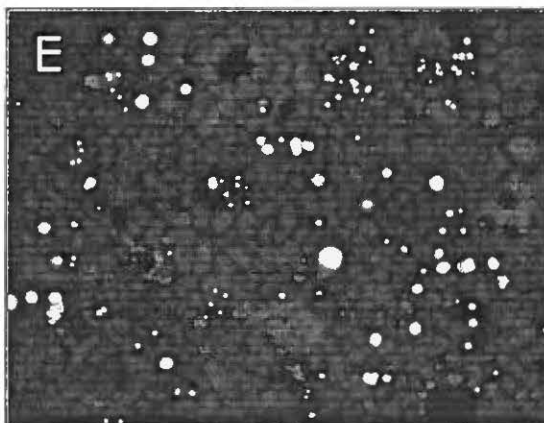
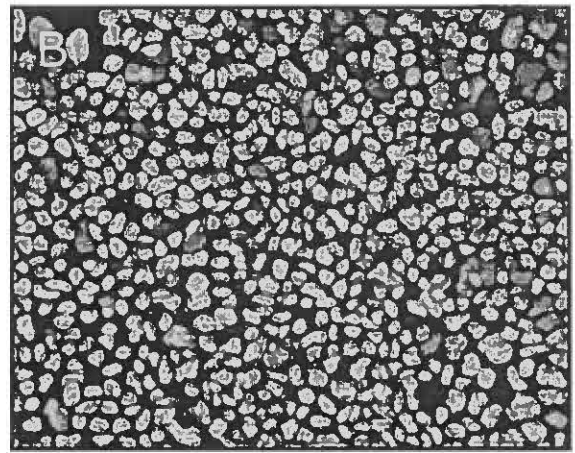
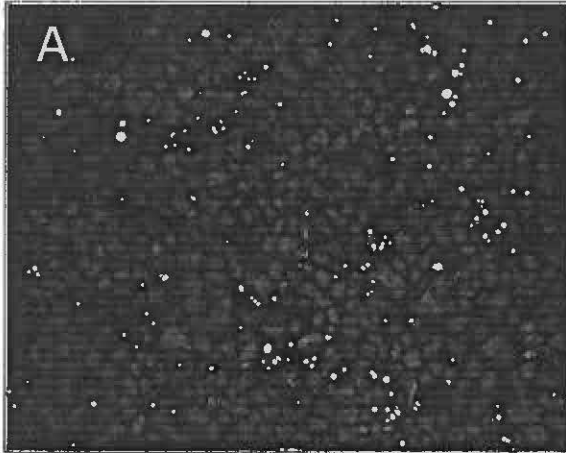


Figure 12. Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de la kinase FAK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 30PC (30 jours post-confluence et différenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D (+CD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

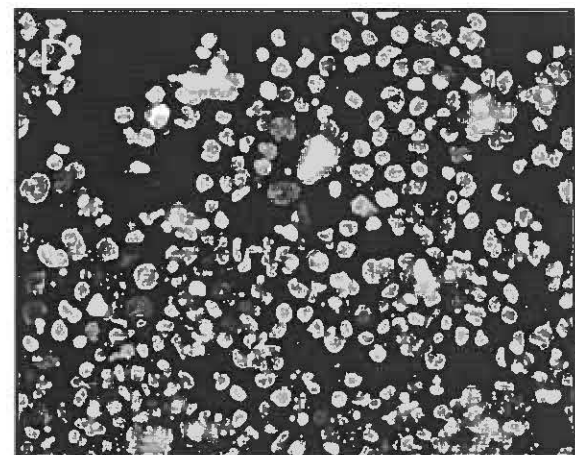
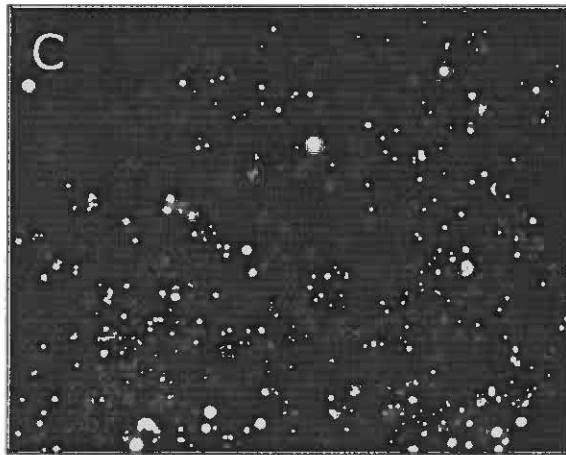
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+CD

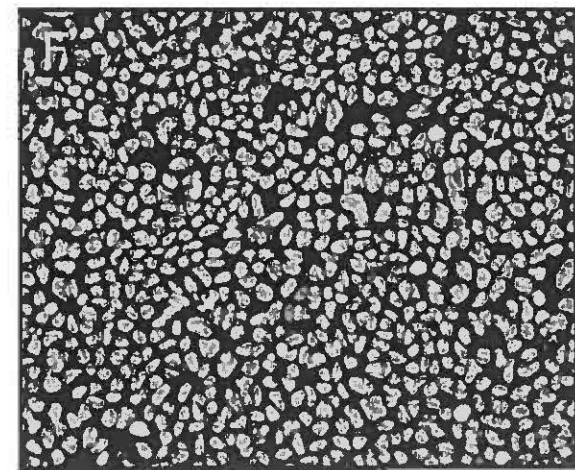
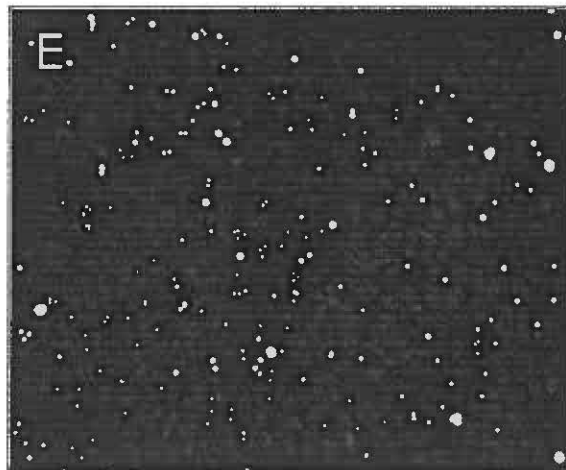
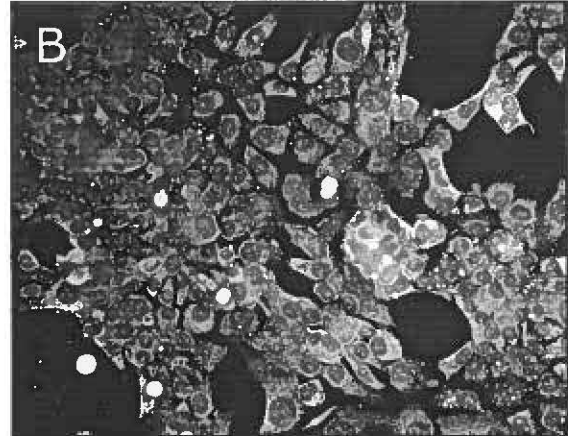


Figure 13. Les cellules HCT116 entrent en anoïkose suite à l'inhibition de la kinase FAK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HCT116 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D (+CD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

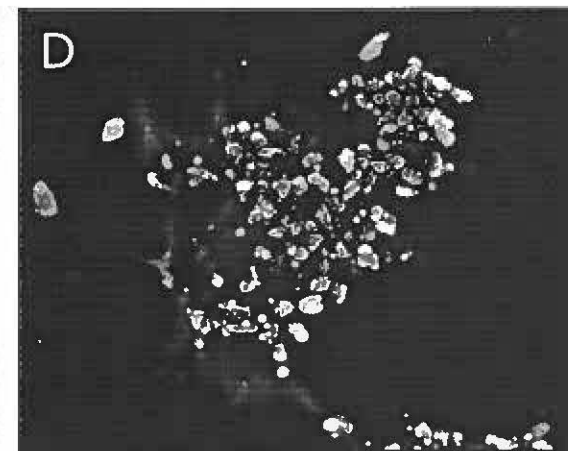
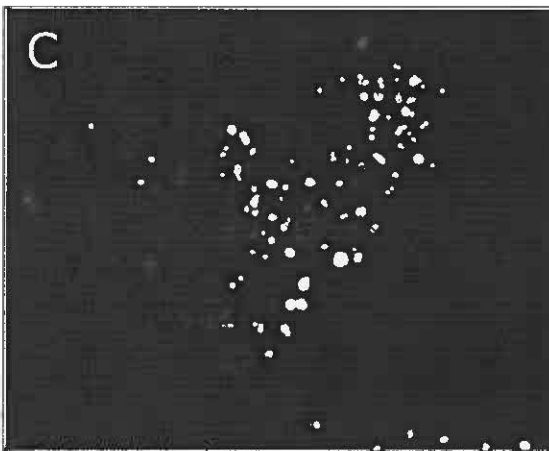
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+CD

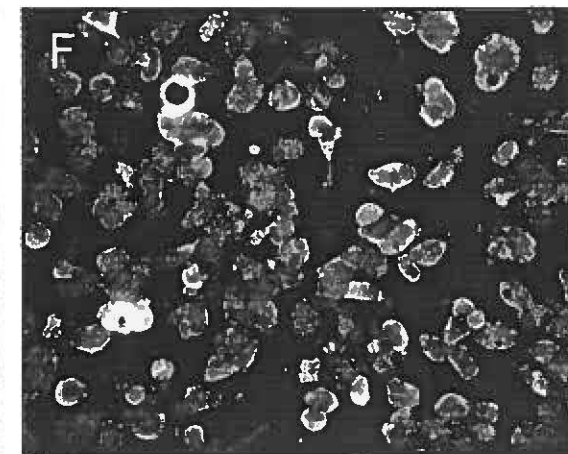
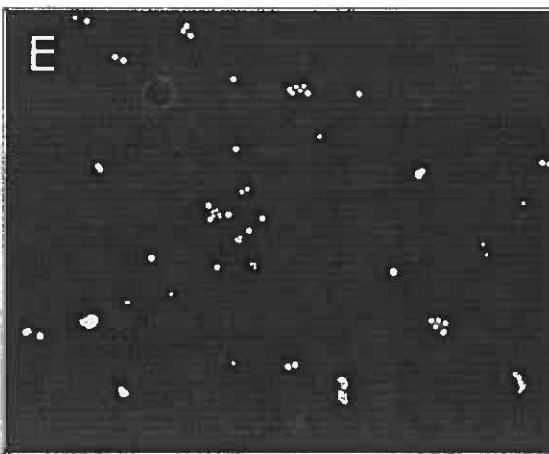
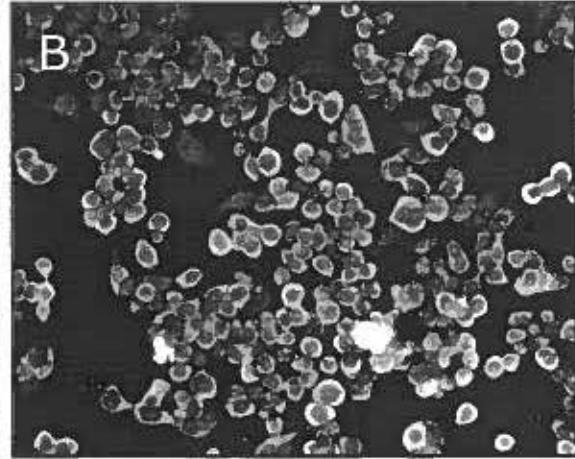
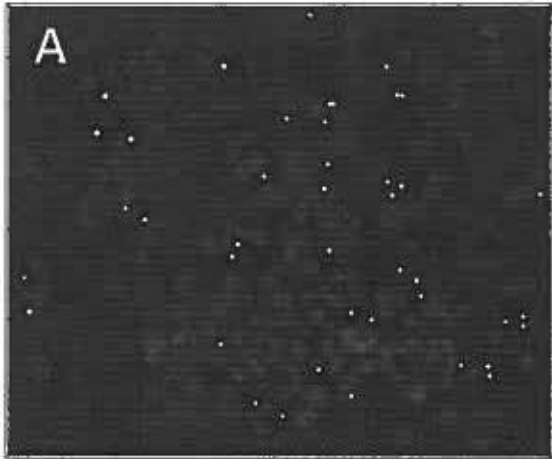


Figure 14. Les cellules HT29 entrent en anoïkose suite à l'inhibition de la kinase FAK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HT29 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D (+CD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

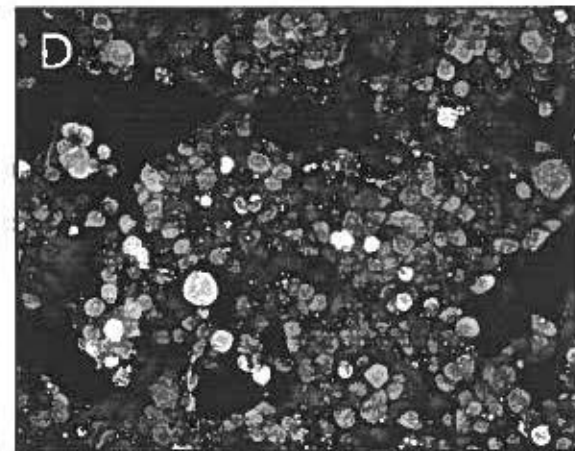
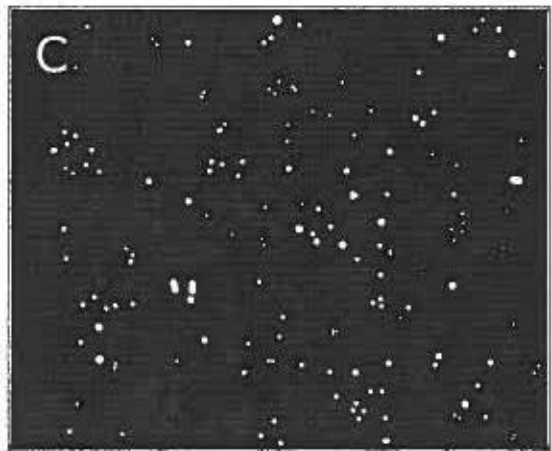
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+CD

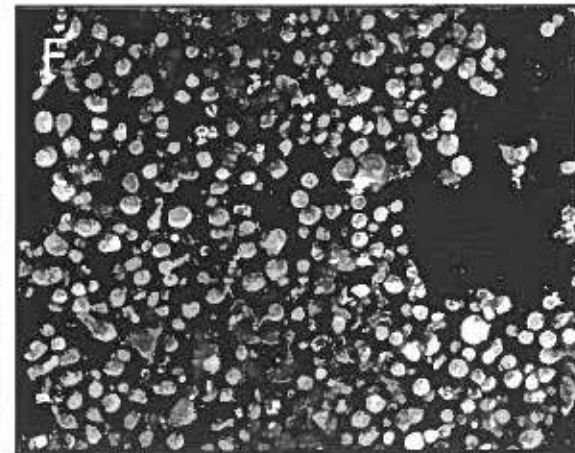
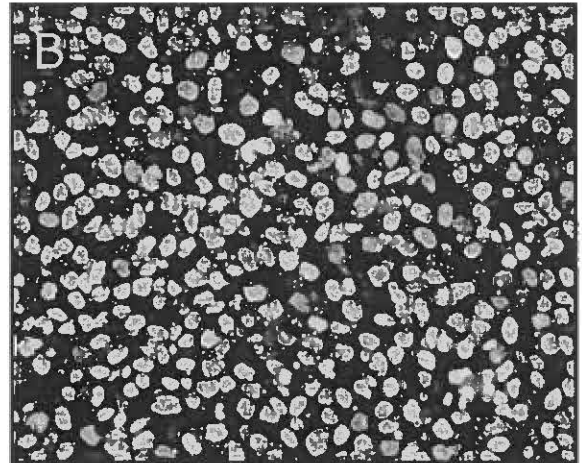
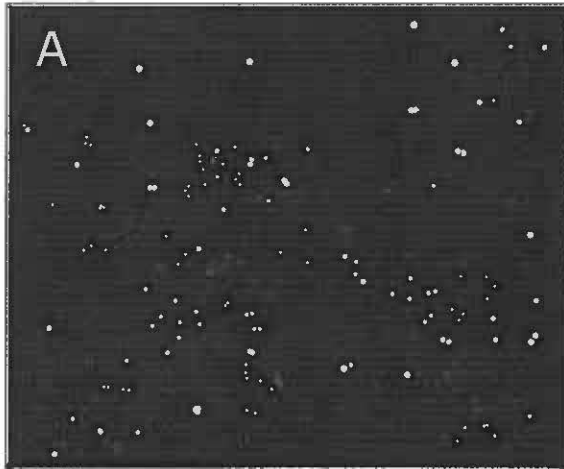


Figure 15. Les cellules T84 entrent en anoïkose suite à l'inhibition de la kinase FAK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules T84 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D (+CD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

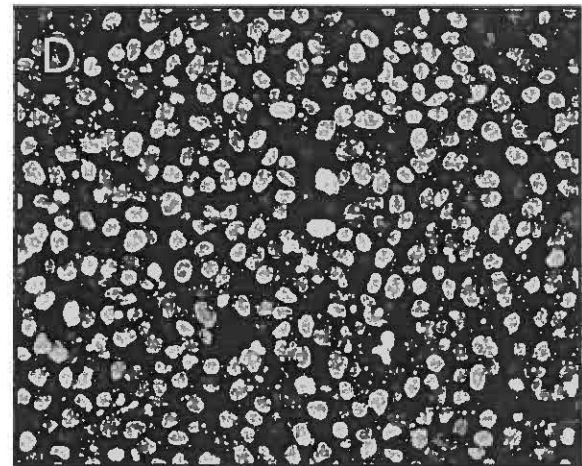
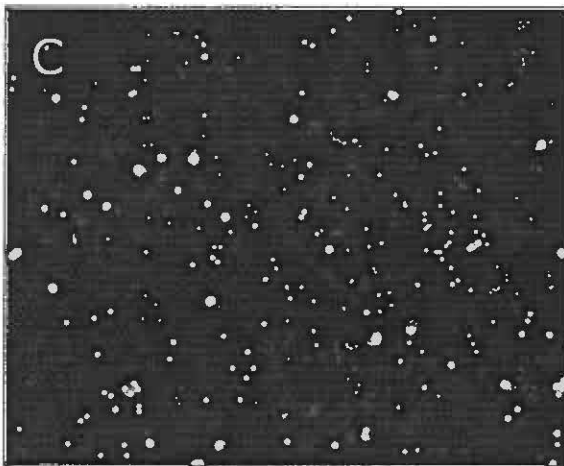
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+CD

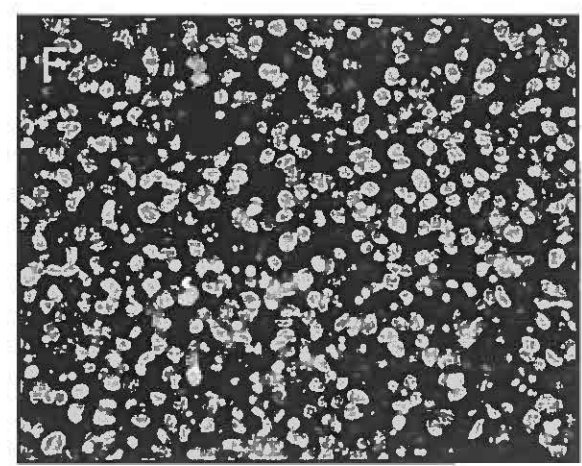
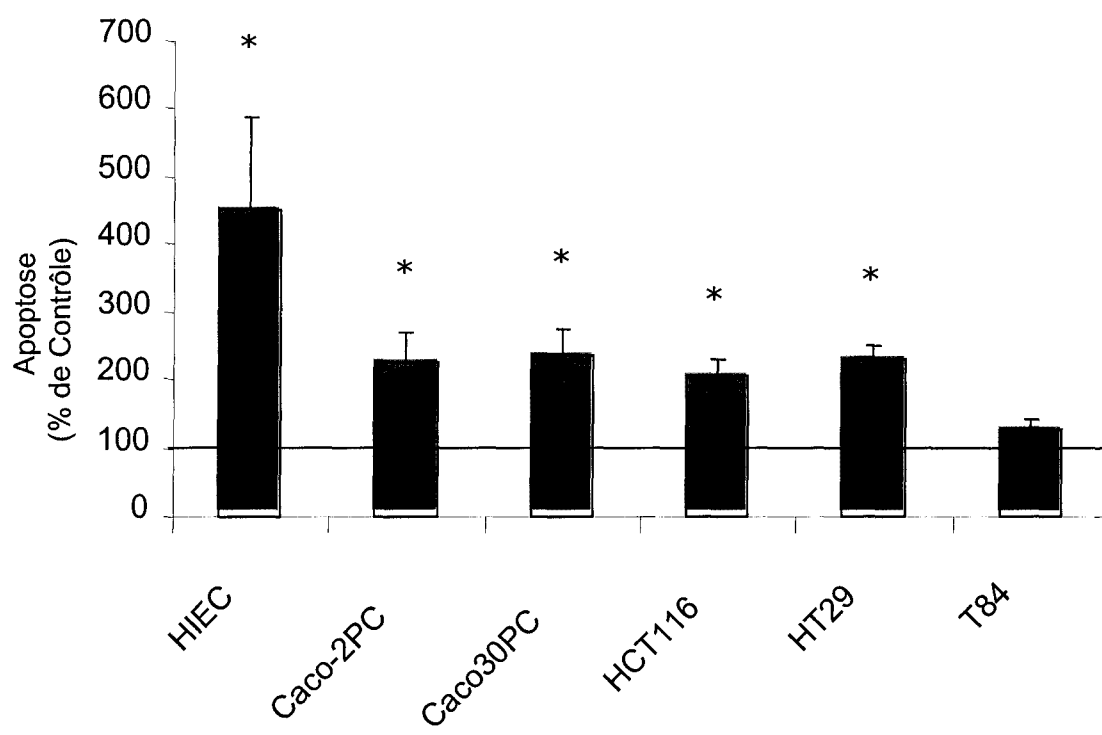


Figure 16. L'inhibition de la kinase FAK induit l'anoïkose chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84. Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) et différenciées (30PC) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84, ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle) ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D (CD), qui est un inhibiteur affectant spécifiquement l'activation de la tyrosine kinase FAK. Des TUNELs *in situ* ont été faits afin d'établir l'index relatif d'apoptose, s'exprimant comme le nombre de cellules apoptotiques pour le traitement CD par rapport au contrôle X100 (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules a été compté pour au moins 3 ($n \geq 3$), expériences et/ou cultures séparées. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.04$) comparée aux contrôles sans sérum.



différencient pas) entrent en anoïkose lors de l'inhibition de FAK avec des sensibilités similaires à celle des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, alors que les cellules T84 (qui se polarisent) n'entrent pas en anoïkose, et ce malgré l'inhibition de FAK.

Tableau 3. L'inhibition de la kinase FAK induit l'anoïkose chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84.

Lignées Cellulaires	(a) Contrôle Sans Sérum (% de cellules apoptotiques)	Génistéine (300 μ M) (% de cellules apoptotiques)	Cytochalasine D (1 μ M) (% de cellules apoptotiques)	(c) Index relatif (% de Contrôle)
HIEC	(b) 5.0 ± 2.5	18.4 ± 3.3	19.7 ± 3.6	$450.6 \pm 139.0 *$
Caco-2PC	9.8 ± 1.8	31.3 ± 2.3	21.6 ± 2.9	$224.7 \pm 44.0 *$
Caco30PC	13.0 ± 1.8	34.5 ± 5.6	30.1 ± 5.4	$233.9 \pm 39.2 *$
HCT116	12.2 ± 2.1	46.0 ± 6.8	23.2 ± 5.0	$205.0 \pm 26.9 *$
HT29	10.2 ± 1.2	21.0 ± 3.2	22.9 ± 2.8	$232.5 \pm 19.4 *$
T84	20.6 ± 1.3	42.2 ± 3.1	26.5 ± 2.9	128.9 ± 11.5

Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (sous confluentes) et différenciées (30 jours post-confluence) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84 (a) ont été maintenues 48h dans un milieu DMEM sans sérum (contrôle), ou en présence de 300 μ M de génistéine, qui est un inhibiteur à large spectre des tyrosines kinases, ou en présence de 1 μ M de cytochalasine D, qui est un inhibiteur affectant spécifiquement l'activation de la tyrosine kinase FAK. (b) Des TUNEL *in situ* ont été faits afin d'établir le pourcentage de cellules apoptotiques, s'exprimant comme étant le nombre de cellules apoptotiques sur le nombre de cellules totales comptées, obtenu pour chaque traitement. (c) L'index relatif a été établi, s'exprimant comme le pourcentage de cellules apoptotiques pour le traitement cytochalasine D par rapport au contrôle (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules ont été comptées pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.04$) comparée aux contrôles sans sérum.

2.3 Impact de l'introduction de constructions mutantes de p125^{FAK} (p45^{FRNK} et Y397F) sur la survie des cellules cancéreuses de côlon T84.

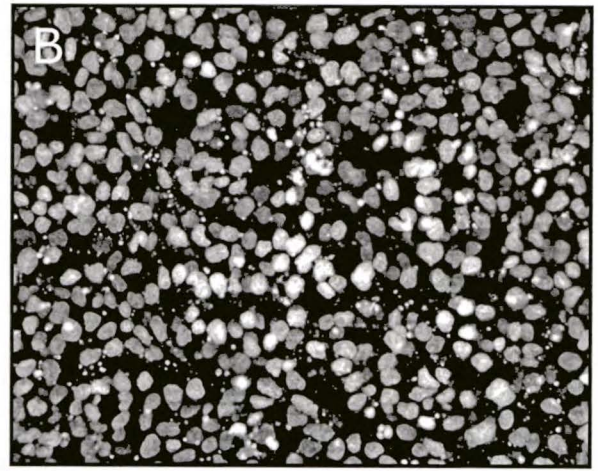
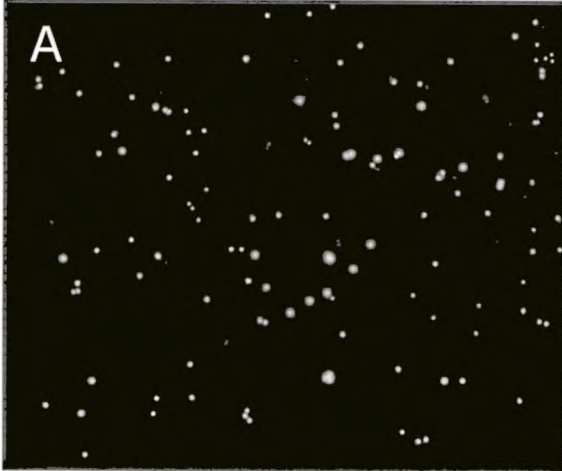
Afin de déterminer si la kinase p125^{FAK} joue un rôle dans la survie des cellules T84, nous avons procédé à plusieurs transfections avec diverses constructions ADNc de FAK. Nous avons donc utilisé une construction de la forme sauvage de la protéine (WT) comme contrôle. Nous avons également utilisé deux constructions mutantes, soient la forme dominante négative naturelle (p45^{FRNK}) et une construction kinase inactive (Y397F). Suite à la transfection, les cellules T84 sont demeurées en absence de sérum pour une période de 24 heures. L'induction de l'apoptose a été visualisée par TUNEL *in situ*. Nous observons que : 1) la présence de FAK wt n'affecte en rien la survie des cellules T84 (figures 17A+B et 18), et que les niveaux d'apoptose observés sont dus à l'absence de sérum (figures 15A+B et 16 ; voir section 2.2) ; 2) l'introduction de la forme dominante négative naturelle, soit p45^{FRNK}, n'augmente point les niveaux apoptotiques des cellules T84 (figures 17C+D et 18) ; et 3) la transfection des cellules T84 avec la construction kinase inactive (FAKY397F) n'a pas d'impact sur leur survie (figures 17E+F et 18). Ces résultats démontrent bien que la kinase FAK n'est pas importante pour la survie des cellules T84.

Figure 17. La survie des cellules T84 n'est pas affectée par l'introduction de constructions mutantes de la protéine p125^{FAK} (p45^{FRNK} et FAKY397F). Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules T84 qui ont été transfectées avec soit la construction FAK sauvage (wt ; A-B), ou avec la forme dominante négative naturelle (FRNK ; C-D), ou avec la construction kinase inactive (Y397F ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C et E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D et F). A-F : Agrandissement original = 20X.

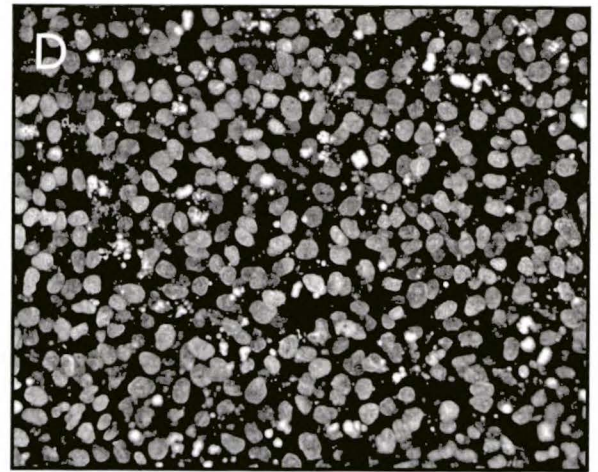
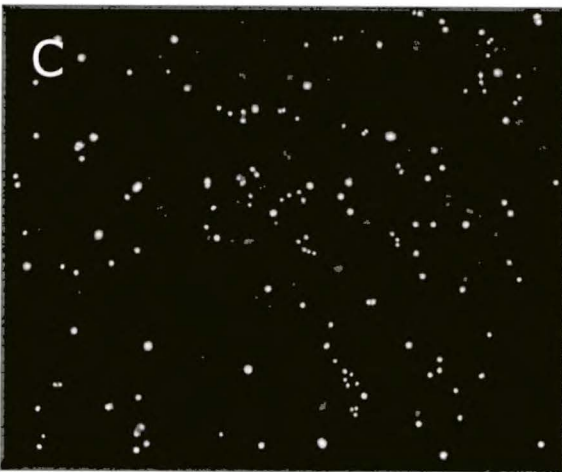
TUNEL *in situ*

DAPI

wt



FRNK



Y397F

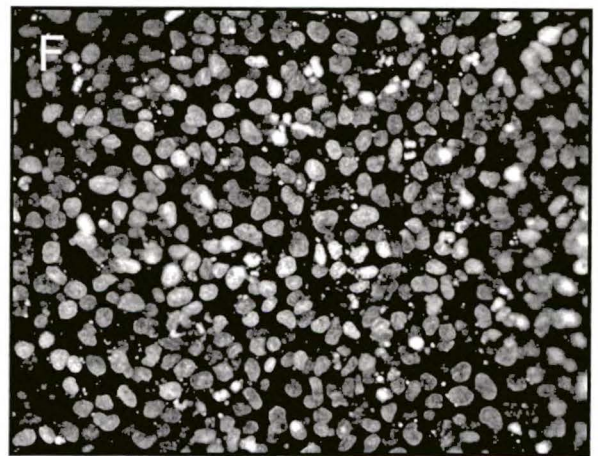


Figure 18. L'introduction de constructions mutantes de p125^{FAK}, soient p45^{FRNK} et FAKY397F, n'induit pas l'anoïkose chez les cellules T84. Les cellules T84 ont été transfectées avec soit une construction FAK sauvage (wt), ou avec une forme dominante négative naturelle (p45^{FRNK}), ou avec une construction kinase inactive (FAKY397F). Après que les cellules aient été maintenues 24h dans un milieu sans sérum suivant la transfection, un TUNEL *in situ* a été fait afin d'établir l'index relatif d'apoptose, s'exprimant comme étant le nombre de cellules apoptotiques sur le nombre de cellules totales comptées X100 par rapport au contrôle, pour une transfection donnée (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules ont été comptées pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées.

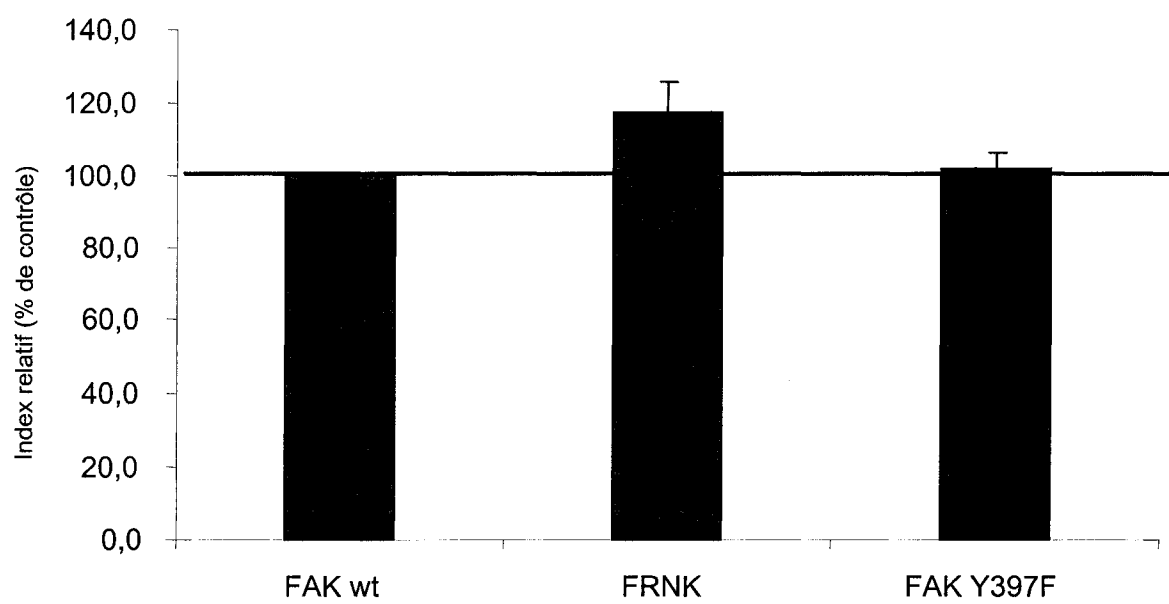


Tableau 4. L'introduction de constructions mutantes de p125^{FAK}, soient p45^{FRNK} et FAKY397F, n'induit pas l'anoïkose chez les cellules T84.

(a) Constructions ADNc	FAK wt	p45 ^{FRNK}	FAK Y397F
(b) T84 (% de cellules apoptotiques)	18.1 ± 1.2	21.1 ± 2.1	18.3 ± 1.9
(c) Index relatif (% de contrôle)	100.0 ± 0.0	117.3 ± 8.2	101.6 ± 4.4

(a) Les cellules T84 ont été transfectées avec soit une construction FAK sauvage (wt), ou avec une forme dominante négative naturelle (p45^{FRNK}), ou avec une construction kinase inactive (FAKY397F). (b) Après que les cellules aient été maintenues 24h dans un milieu sans sérum suivant la transfection, un TUNEL *in situ* a été fait afin d'établir le pourcentage de cellules apoptotiques, s'exprimant comme étant le nombre de cellules apoptotiques sur le nombre de cellules totales comptées, obtenu pour chaque transfection. (c) L'index relatif a été établi, s'exprimant comme le pourcentage de cellules apoptotiques pour une transfection donnée par rapport au contrôle (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules ont été comptées pour au moins 3 (n ≥ 3) expériences et/ou cultures séparées.

2.4 Effet de l'anoïkose sur les niveaux d'activation de p125^{FAK}.

Par la suite, nous avons vérifié l'effet de l'anoïkose (polyHEMA/suspension) sur les niveaux d'activation de FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84) ainsi que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été comparés à ceux des cultures contrôles (%)

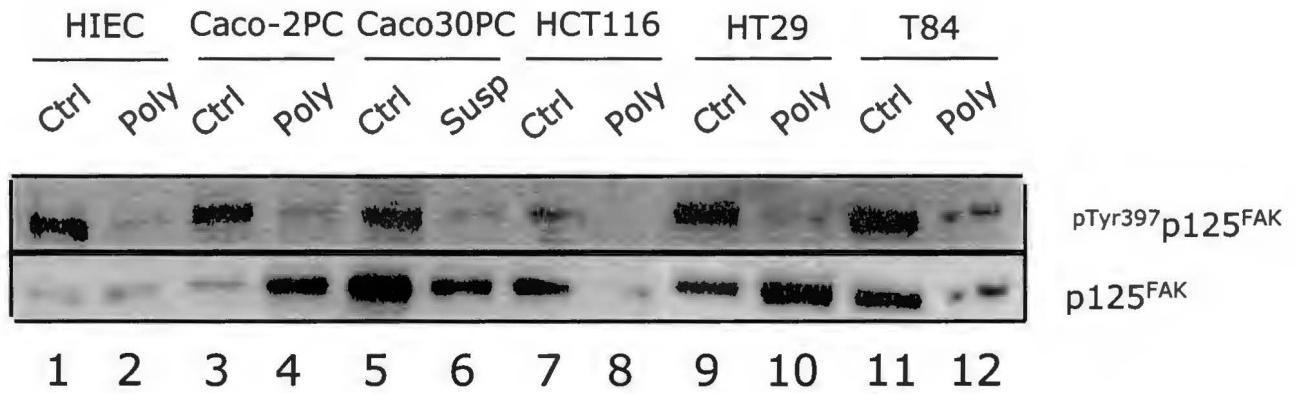
de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux d'activation de p125^{FAK} diminuent significativement suite à l'inhibition de l'adhésion cellulaire et cela, chez toutes les lignées cellulaires analysées (figure 19A+B).

2.5 Effet de l'inhibition de FAK sur les niveaux d'activation de la kinase chez différentes lignées de cancer colorectal.

Nous avons vérifié l'efficacité de l'inhibition de FAK par la cytochalasine D à une concentration de 1 μ M sur les niveaux d'activation de la kinase chez nos différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84), ainsi que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux d'activation de FAK diminuent significativement suite à l'inhibition de la kinase et ce, chez toutes les lignées cellulaires analysées (figures 20A+B), confirmant ainsi l'efficacité des traitements.

Figure 19. La perte d'adhésion cellulaire induit une forte baisse des niveaux d'activation de la kinase p125^{FAK} chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p125^{FAK} chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) et gardées en suspension ou sur polyhema (susp/poly ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine FAK a été immunoprécipitée (IP : FAK) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 μ l/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active de FAK (WB : p^{Tyr397}p125^{FAK}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine FAK (WB : p125^{FAK}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.03$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B

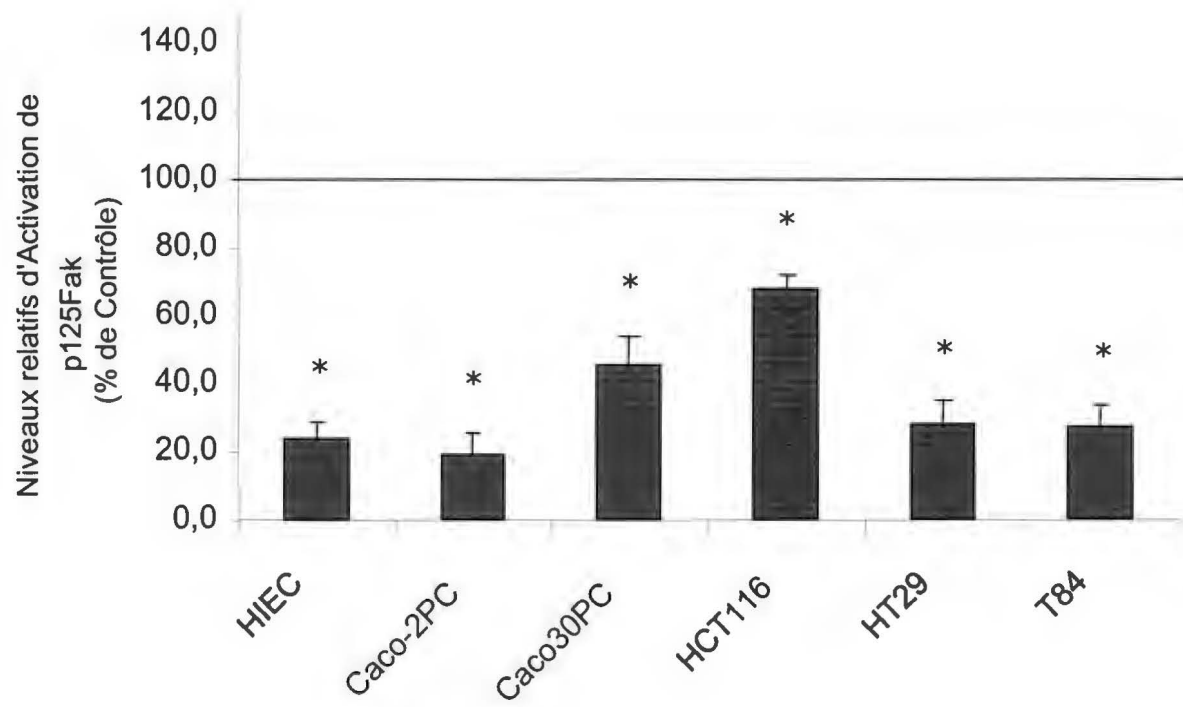
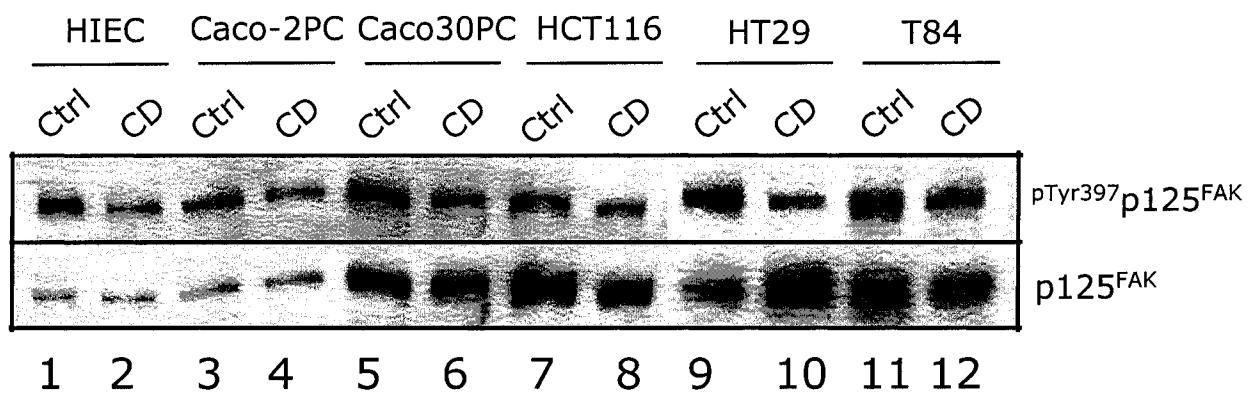
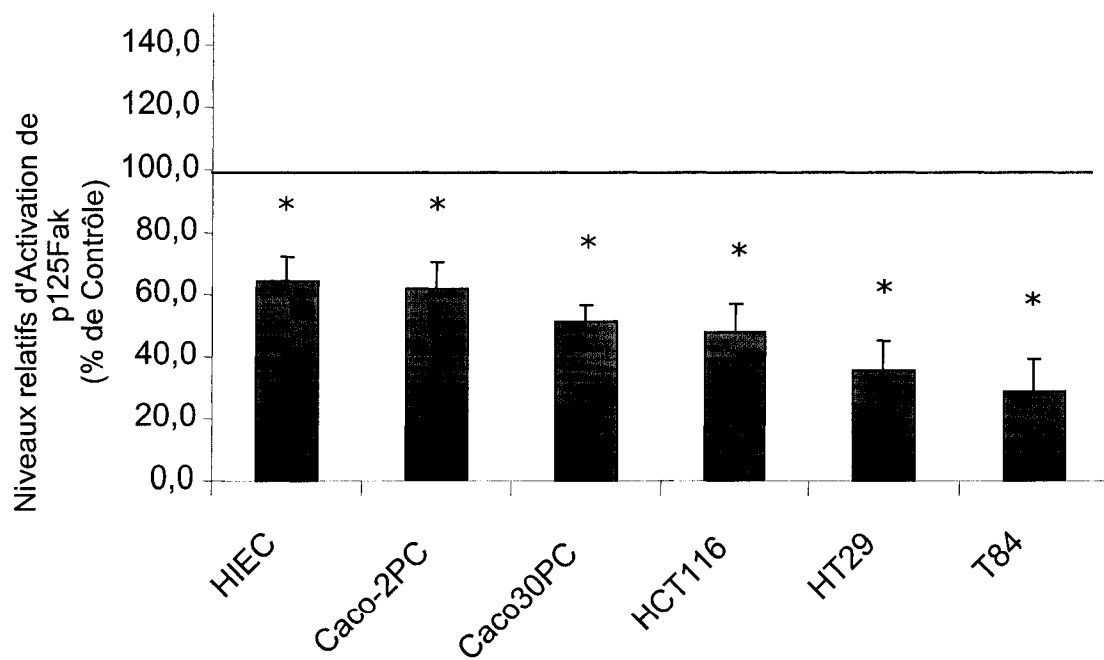


Figure 20. L'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D induit une baisse significative des niveaux d'activation de la kinase chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p125^{FAK} chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 1 μ M de cytochalasine D (CD ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine FAK a été immunoprécipitée (IP : FAK) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 μ l/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active de FAK (WB : p^{Tyr397}p125^{FAK}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine FAK (WB : p125^{FAK}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.02$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B

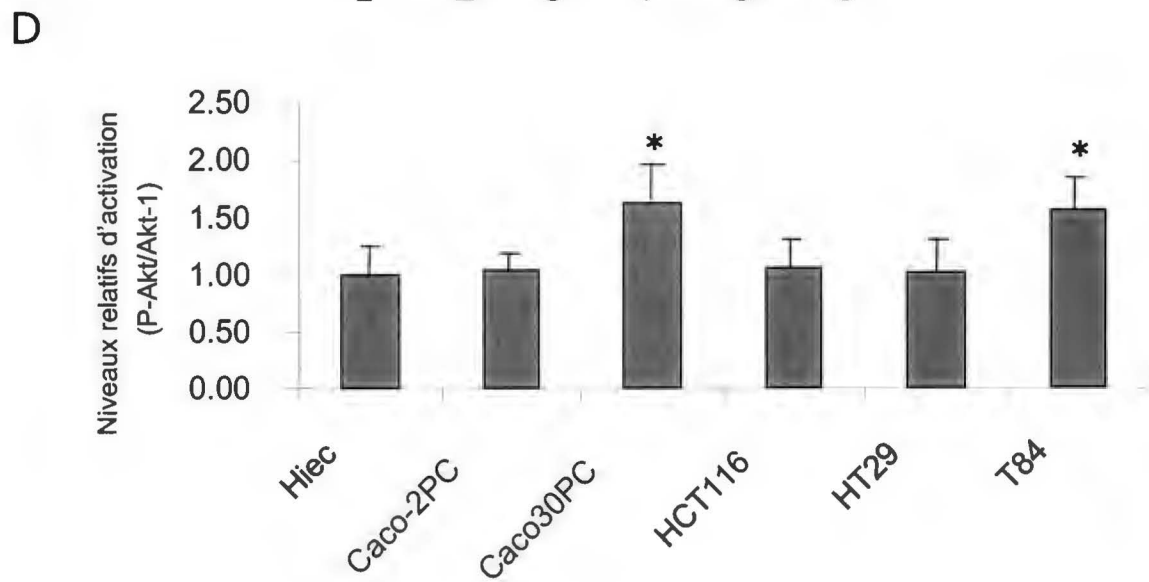
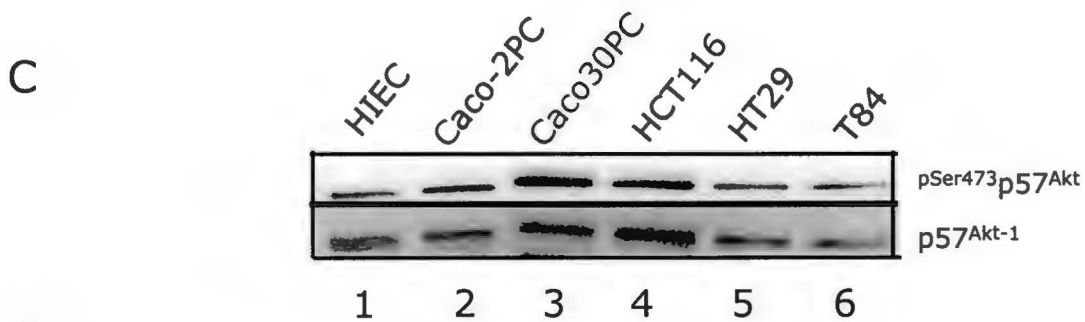
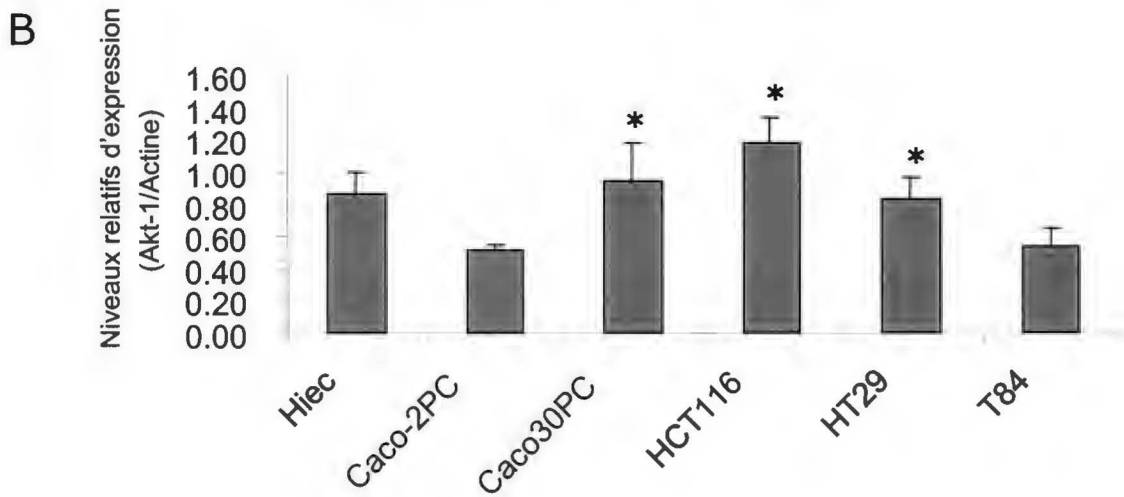
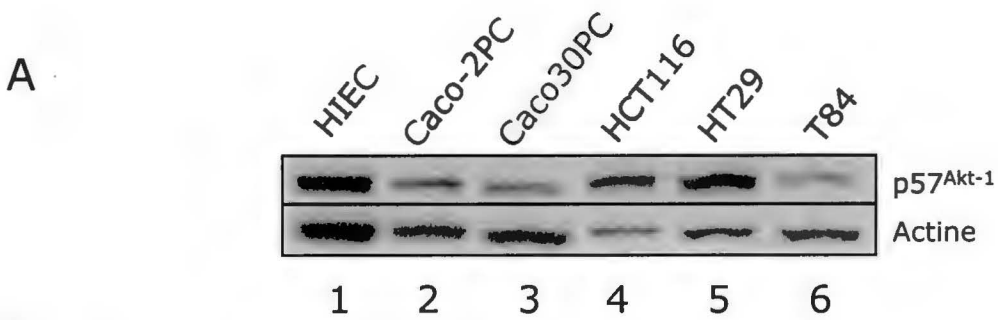


3. La voie PI3-K/Akt-1 et la survie cellulaire

3.1 Niveaux d'expression et d'activation de base d'Akt-1 chez différentes lignées de cancer colorectal.

Dans un premier temps, nous avons analysé par Western Blot les niveaux d'expression et d'activation de base d'Akt-1 chez différentes lignées de cancer colorectal, soient les cellules HCT116, HT29 et T84. Ceci a été fait dans le but de comparer ces niveaux avec ceux observés chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Tel que résumé à la figure 21, nous observons que : 1) les niveaux d'expression et d'activation d'Akt-1 sont plus élevés chez les cellules différenciées que chez les cellules indifférenciées (figure 21A à D) ; 2) les niveaux d'expression d'Akt-1 chez les cellules HCT116 et HT29 s'apparentent à ceux des cellules différenciées (figure 21A+B) ; 3) les niveaux d'expression d'Akt-1 chez les cellules T84 s'apparentent à ceux des cellules indifférenciées (figure 21A+B) ; 4) les niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules HCT116 et HT29 ressemblent à ceux des cellules indifférenciées (figure 21C+D) ; et 5) les niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules T84 ressemblent à ceux des cellules différenciées (figure 21C+D). Ces observations indiquent que les niveaux d'expression de base d'Akt-1 chez nos différentes lignées de cancer colorectal ne correspondent pas à leur degré de dédifférenciation, puisque chez nos cellules cancéreuses qui ne se différencient/polarisent pas (HCT116, HT29), ces niveaux sont semblables à ceux des cellules différenciées, alors que chez nos cellules cancéreuses qui se polarisent (T84), ces niveaux sont semblables à ceux des

Figure 21. Les niveaux d'activation de base d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal correspondent à leur degré de dédifférenciation. A : Analyse Western Blot représentative de l'expression d'Akt-1 chez les cellules HIEC (ligne 1), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (ligne 2) et différenciées (30PC) (ligne 3), et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon ; les cellules HCT116 (ligne 4), HT29 (ligne 5) et T84 (ligne 6). Les protéines totales (50 μ g/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour la protéine Akt-1. La détection de l'actine a aussi été analysée pour des raisons de normalisation. B : Niveaux relatifs d'expression d'Akt-1 chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'expression d'Akt-1 ont été déterminés par le ratio de $p57^{Akt-1}$ /Actine. C : Analyse Western Blot représentative de l'activation de $p57^{Akt-1}$ chez les différentes lignées utilisées en A. Les protéines totales ont été séparées comme représenté en A et ont été détectées avec des anticorps spécifiques de la forme active d'Akt-1 ($pp57^{Akt-1}$), phospho-Ser-473, et de la protéine Akt-1 ($p57^{Akt-1}$). D : Niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été déterminés par le ratio de $pp57^{Akt-1}/p57^{Akt-1}$. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) cultures séparées et indépendantes pour chaque lignée cellulaire analysée. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.05$) en comparaison aux Caco-2/15 -2PC.



cellules indifférenciées. Cependant, ces observations indiquent que les niveaux d'activation de base d'Akt-1 chez nos différentes lignées de cancer colorectal correspondent à leur degré de dédifférenciation, puisque chez nos cellules cancéreuses qui ne se différencient/polarisent pas (HCT116 et HT29), ces niveaux corrèlent avec ceux des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, alors que chez nos cellules cancéreuses qui se polarisent (T84), ces niveaux corrèlent avec ceux des cellules épithéliales intestinales différenciées.

3.2 Impact de l'inhibition de la PI3-K sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal.

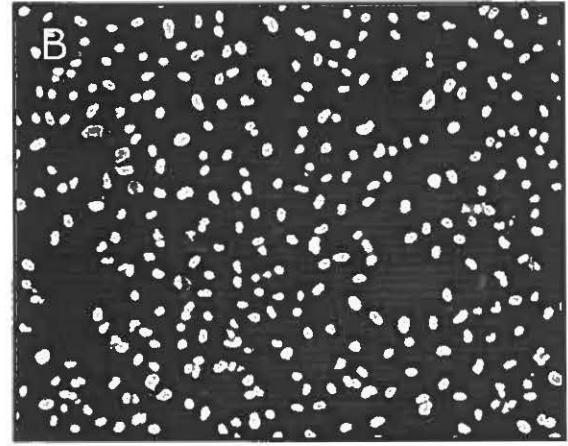
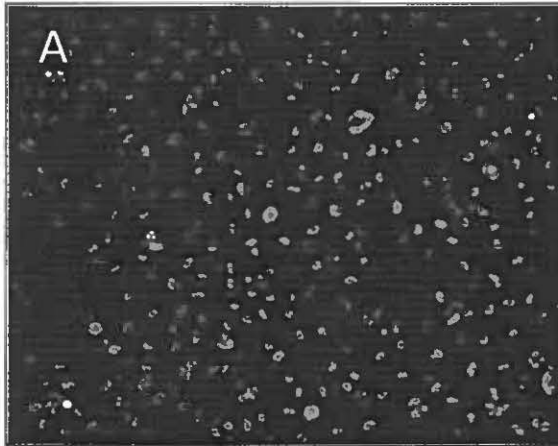
Nous avons vérifié l'impact de l'inhibition de la PI3-K par le LY294002 (30 μ M) sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal utilisées (HCT116, HT29 et T84). À des fins de comparaison, cela a également été vérifié chez des cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et des cellules différenciées (Caco-2/15 30PC). Un traitement à la génistéine (300 μ M) a aussi été utilisé comme contrôle positif d'apoptose. L'induction de l'apoptose a été visualisée par TUNEL *in situ*. Nous observons que : 1) l'absence de sérum n'induit pas l'apoptose chez la plupart de nos types cellulaires, excepté chez nos cellules T84 qui semblent être plus sensibles à l'absence de sérum (figures 22A+B, 23A+B, 24A+B, 25A+B, 26A+B, 27A+B) ; 2) le traitement à la génistéine, comme nous nous y attendions (Gauthier et al., 2001a), induit fortement l'apoptose chez tous les types cellulaires utilisés (figures 22C+D, 23C+D, 24C+D, 25C+D, 26C+D, 27C+D) ; 3) l'exposition au LY294002 induit l'apoptose tant

Figure 22. Les cellules HIEC sont sensibles à l'inhibition de la PI3-K. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 30 μ M de LY294002 (+LY ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 10X.

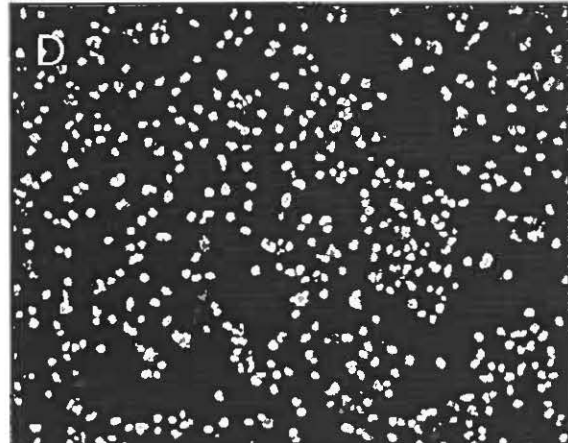
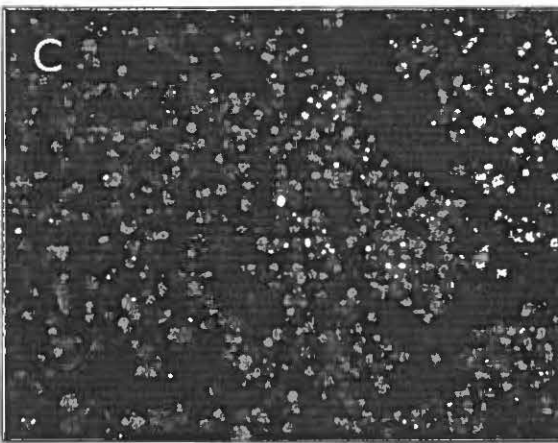
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+LY

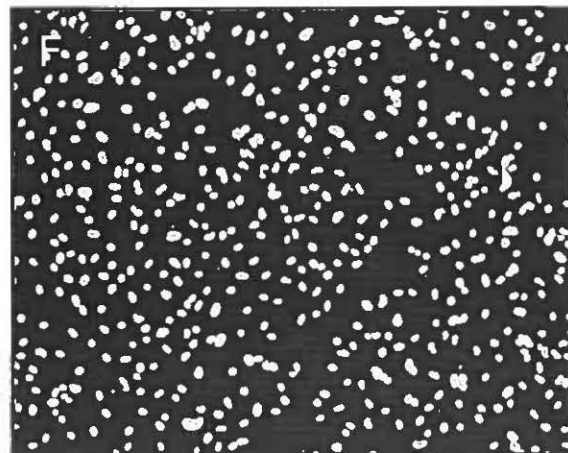
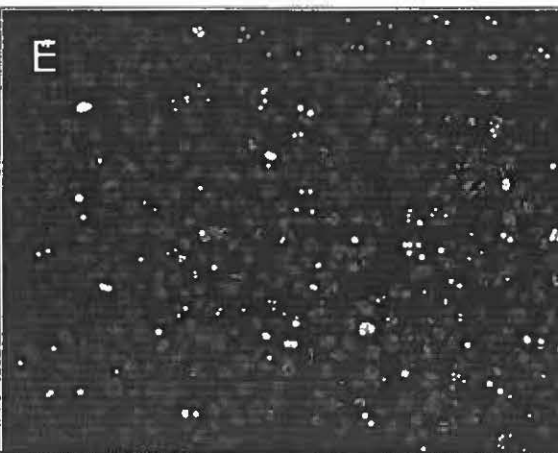
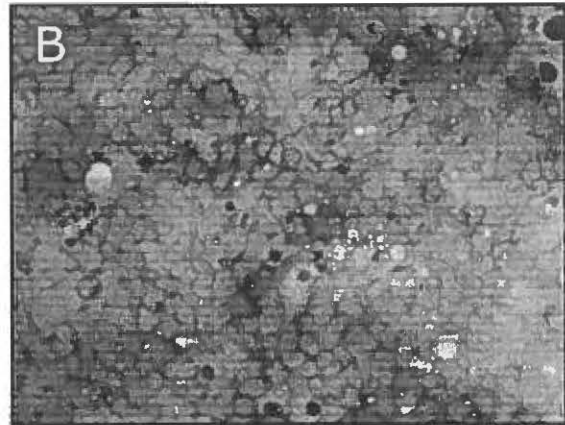
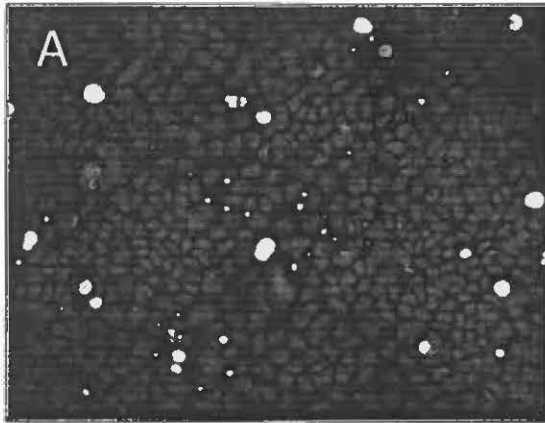


Figure 23. Les cellules Caco-2PC sont sensibles à l'inhibition de la PI3-K. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 - 2PC (sous confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 30 μ M de LY294002 (+LY ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

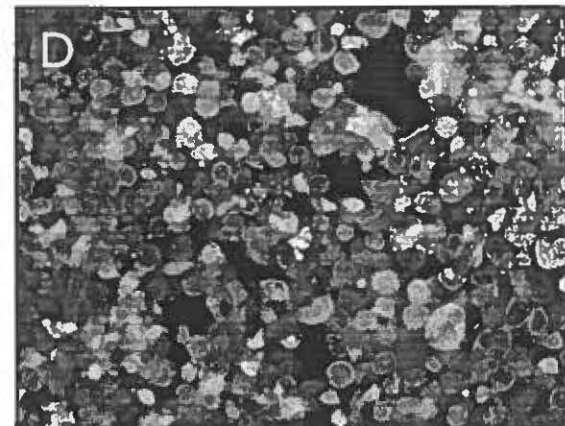
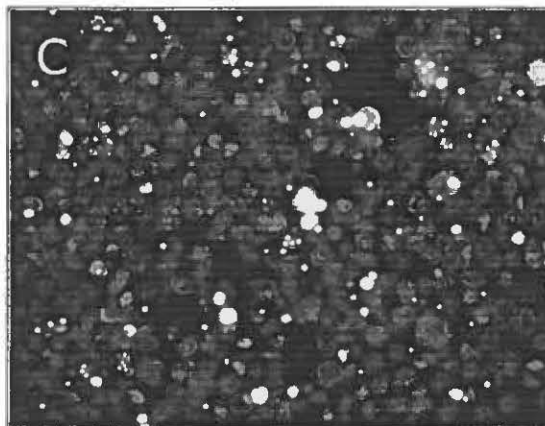
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+LY

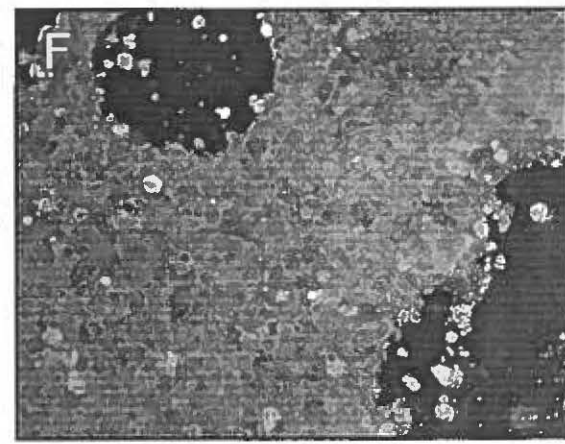
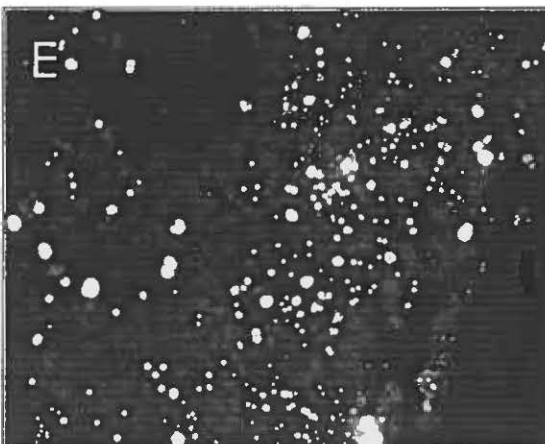
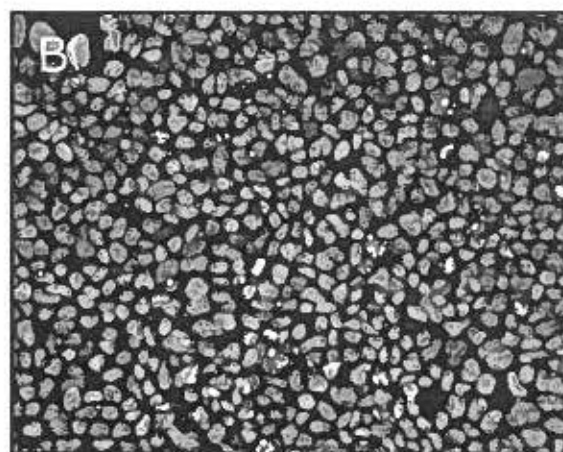
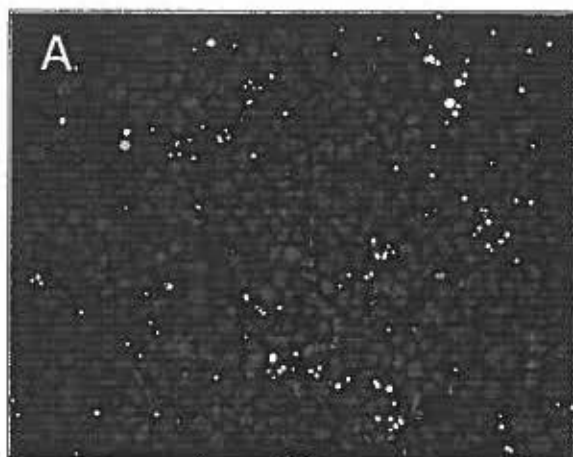


Figure 24. Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de la PI3-K. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 30PC (30 jours post-confluence et différenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 30 μ M de LY294002 (+LY ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

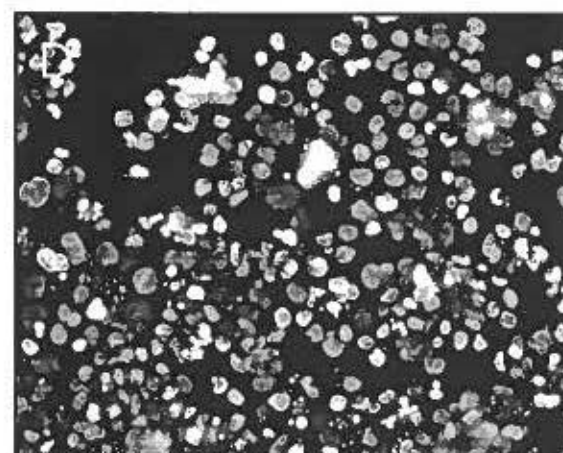
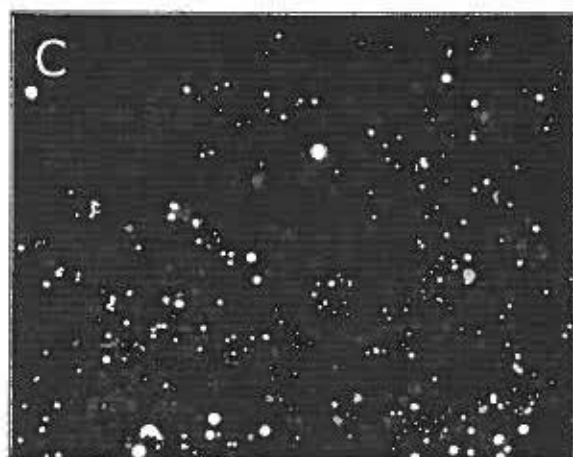
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+LY

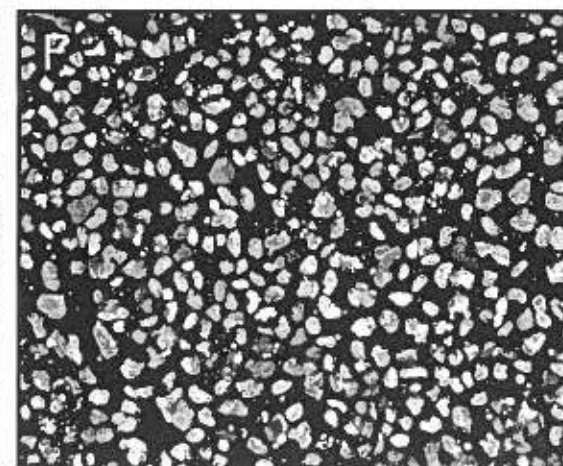
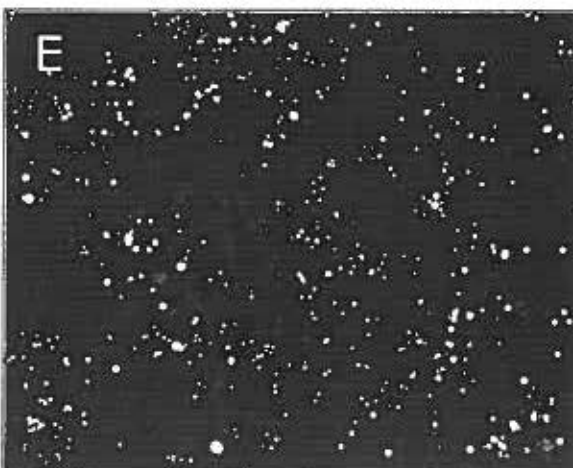
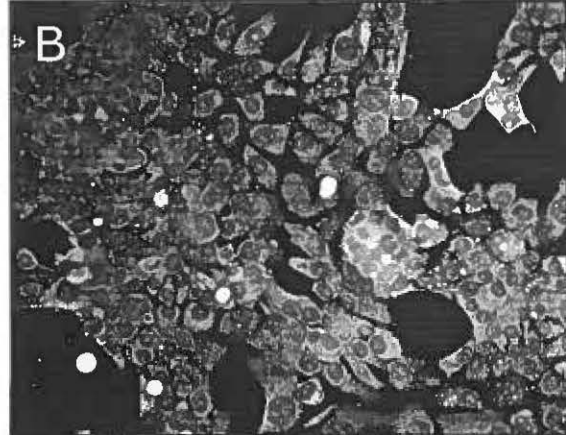
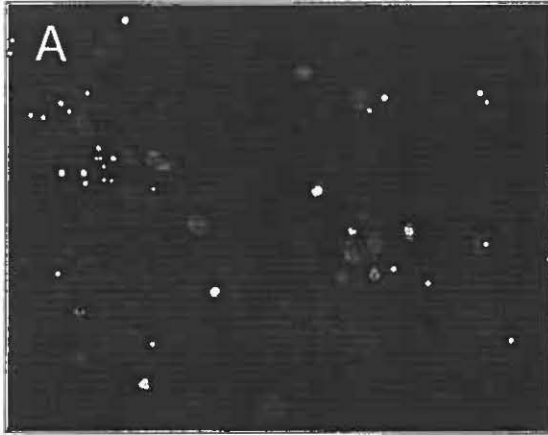


Figure 25. Les cellules HCT116 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de la PI3-K. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HCT116 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 30 μ M de LY294002 (+LY ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+LY

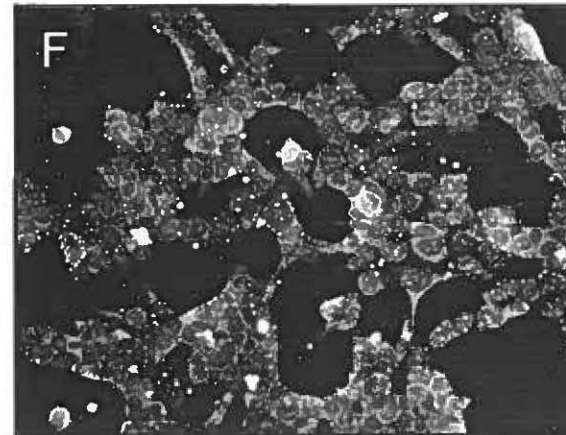
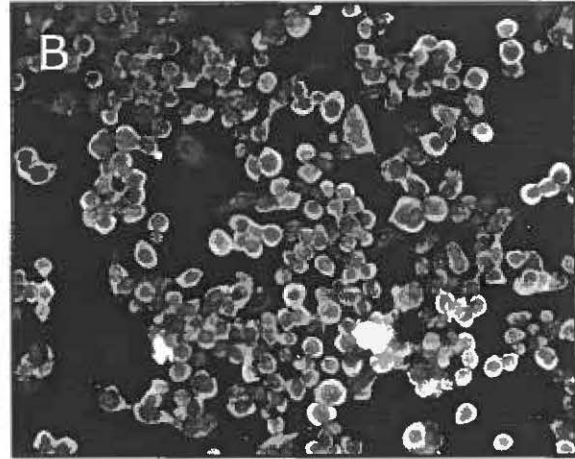
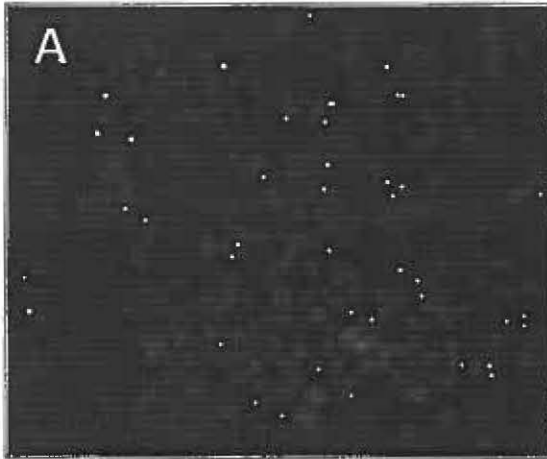


Figure 26. Les cellules HT29 entrent en apoptose suite à l'inhibition de la PI3-K. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HT29 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 30 μ M de LY294002 (+LY ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

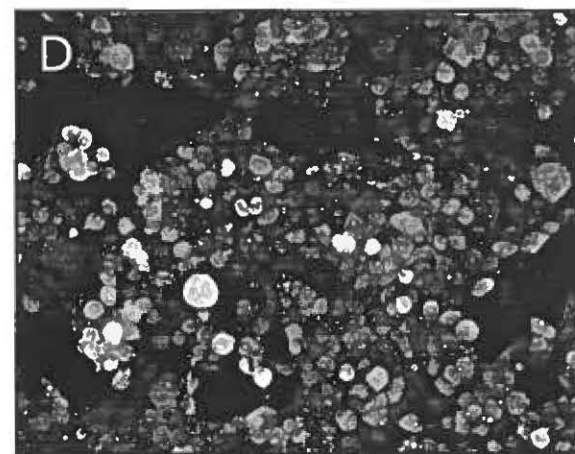
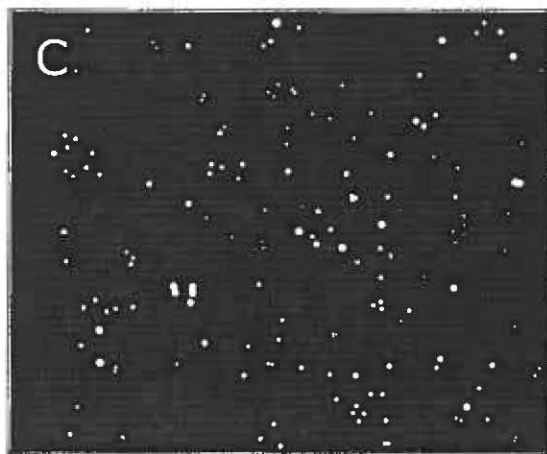
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+LY

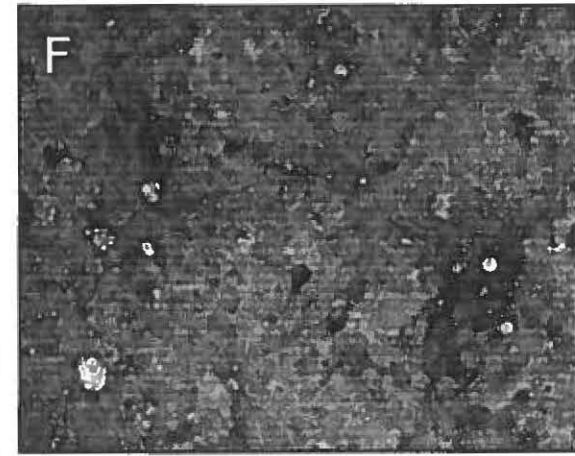
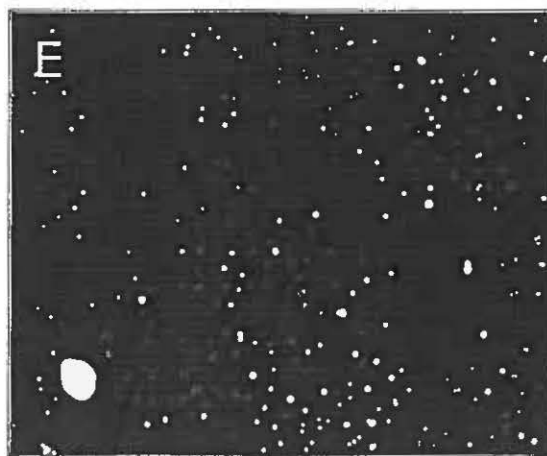
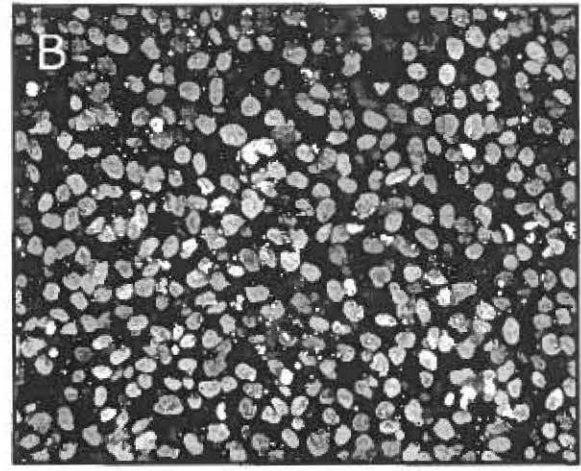
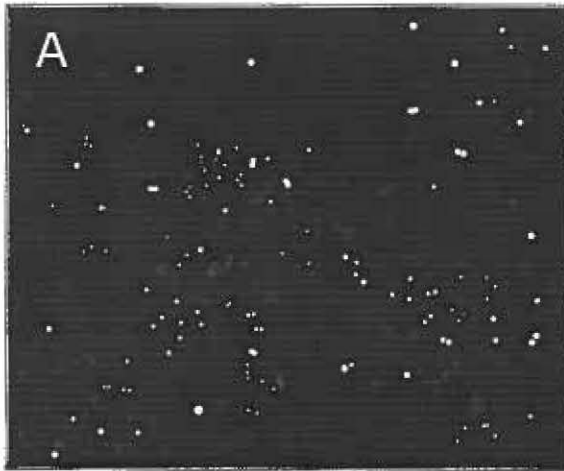


Figure 27. Les cellules T84 entrent en apoptose suite à l'inhibition de la PI3-K. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules T84 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 30 μ M de LY294002 (+LY ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

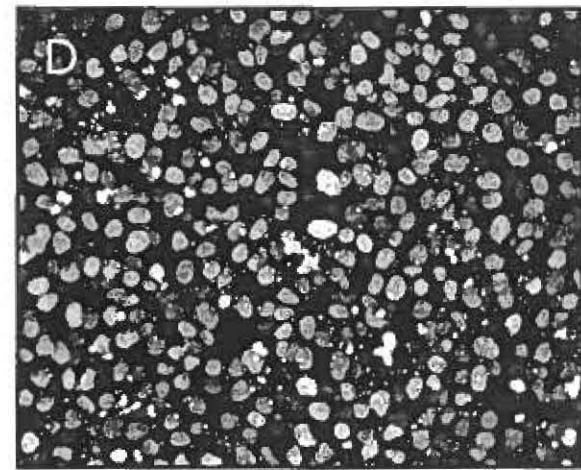
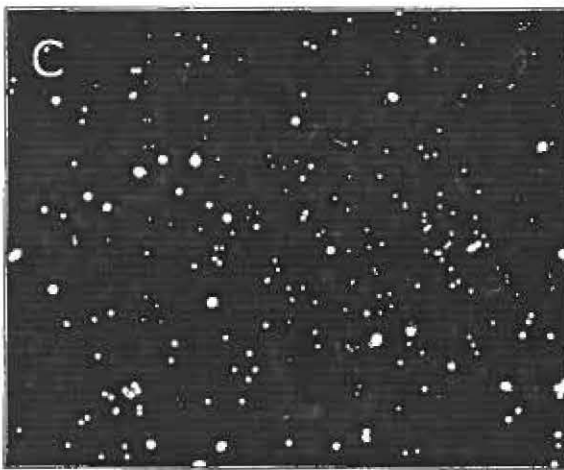
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+LY

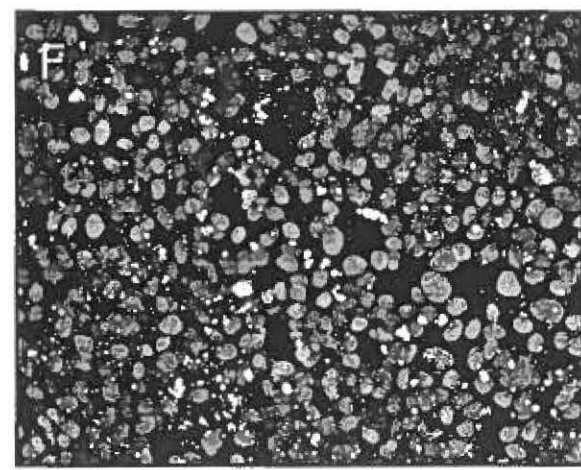
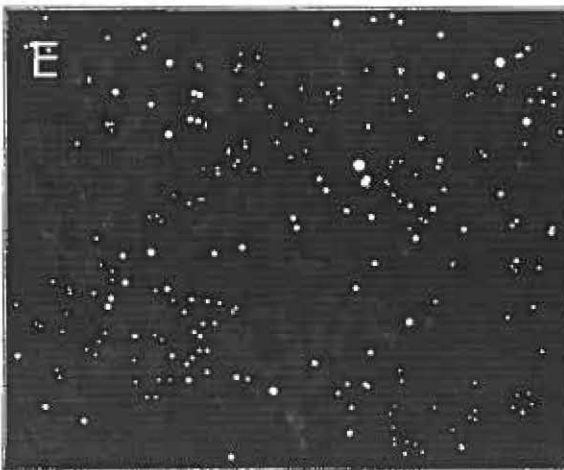
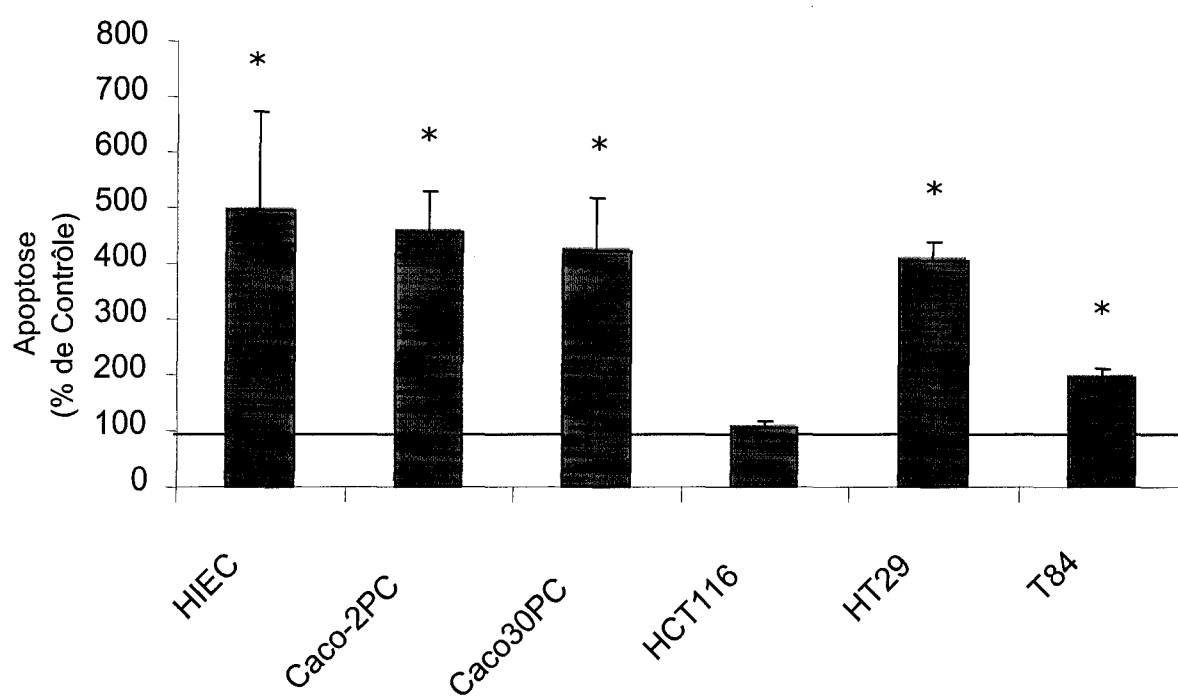


Figure 28. L'inhibition de la PI3-K induit l'apoptose chez les cellules HT29 et T84, mais non chez les cellules HCT116. Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) et différenciées (30PC) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84, ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle) ou en présence de 30 μ M de LY294002 (LY), qui est un inhibiteur affectant spécifiquement l'activité catalytique de la PI3-K. Des TUNELs *in situ* ont été faits afin d'établir l'index relatif d'apoptose, s'exprimant comme le nombre de cellules apoptotiques pour le traitement LY par rapport au contrôle X100 (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules a été compté pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.001$) comparée aux contrôles sans sérum.



chez les cellules indifférenciées que différenciées (figures 22E+F, 23E+F, 24E+F et 28), et comme nous nous y attendions (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004) ; et 4) le LY induit également l'apoptose chez les cellules HT29 et T84, mais non chez les cellules HCT116, où nous n'observons pas de mort cellulaire, donc aucune différence statistiquement significative comparativement au contrôle (figures 25E+F, 26E+F, 27E+F et 28). Ces résultats indiquent que les cellules HT29 (qui ne se différencient pas) et les cellules T84 (qui se polarisent) exhibent des susceptibilités à l'apoptose qui sont similaires à celles des cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées lors de l'inhibition de la PI3-K. Cependant, les cellules HCT116 (qui ne se différencient pas) n'entrent pas en apoptose, et ce malgré l'inhibition de la PI3-K.

Tableau 5. L'inhibition de la PI3-K induit l'apoptose chez les cellules HT29 et T84, mais non chez les cellules HCT116.

Lignées Cellulaires	(a) Contrôle Sans Sérum (% de cellules apoptotiques)	Génistéine (300 µM) (% de cellules apoptotiques)	LY294002 (30 µM) (% de cellules apoptotiques)	(c) Index relatif (% de Contrôle)
HIEC	(b) 5.0 ± 2.5	18.4 ± 3.3	20.5 ± 3.0	494.0 ± 177.3 *
Caco-2PC	9.8 ± 1.8	31.3 ± 2.3	44.8 ± 2.7	458.3 ± 66.9 *
Caco30PC	13.0 ± 1.8	34.5 ± 5.6	53.7 ± 6.1	423.1 ± 94.0 *
HCT116	12.2 ± 2.1	46.0 ± 6.8	11.2 ± 2.4	104.3 ± 12.2
HT29	10.2 ± 1.2	21.0 ± 3.2	40.4 ± 7.9	407.3 ± 32.2 *
T84	20.6 ± 1.3	42.2 ± 3.1	40.4 ± 4.4	195.9 ± 13.4 *

Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (sous confluentes) et différenciées (30 jours post-confluence) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84 (a) ont été maintenues 48h dans un milieu DMEM sans sérum

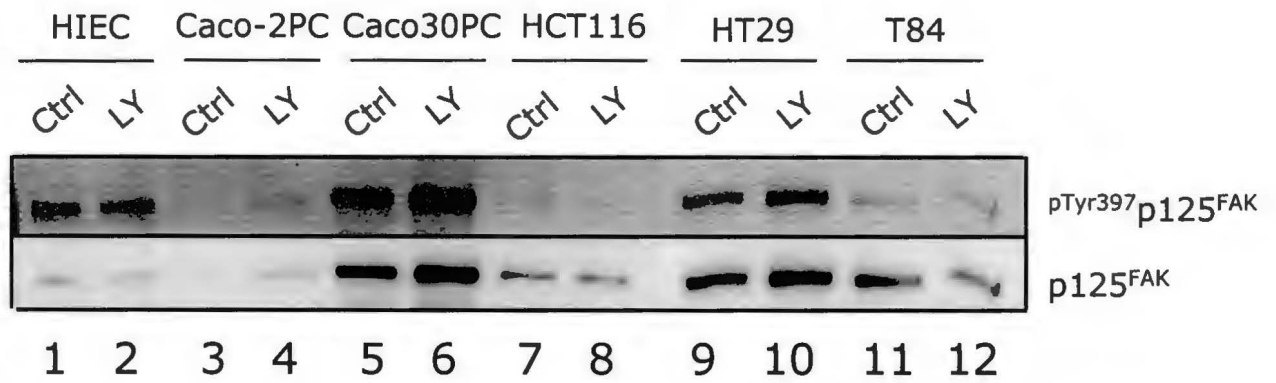
(contrôle), ou en présence de 300 μM de génistéine, qui est un inhibiteur à large spectre des tyrosines kinases, ou en présence de 30 μM de LY294002 (LY), qui est un inhibiteur de la PI3-Kinase. (b) Des TUNEL *in situ* ont été faits afin d'établir le pourcentage de cellules apoptotiques, s'exprimant comme étant le nombre de cellules apoptotiques sur le nombre de cellules totales comptées, obtenu pour chaque traitement. (c) L'index relatif a été établi, s'exprimant comme le pourcentage de cellules apoptotiques pour le traitement LY par rapport au contrôle (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules ont été comptées pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.001$) comparée aux contrôles sans sérum.

3.3 Effet de l'inhibition de la PI3-K sur les niveaux d'activation de FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal.

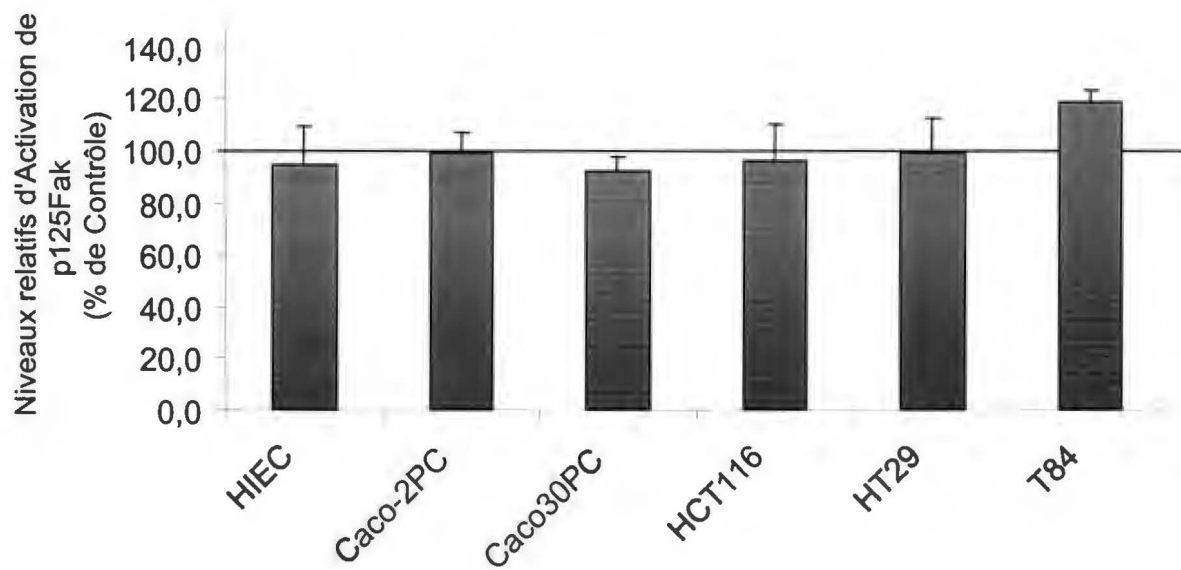
En premier lieu, nous nous sommes assurés de la spécificité de l'inhibiteur LY. Donc, nous avons vérifié si l'inhibition de la PI-3K (LY-30 μM), qui est située en aval de FAK dans la cascade de signalisation, pouvait affecter les niveaux d'activation de p125^{FAK} . Cela a été effectué chez les cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC), les cellules différenciées (Caco-2/15 30PC) et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon utilisées (HCT116, HT29 et T84). Les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation de FAK ne semblent pas être affectés suite à l'inhibition de la PI3-K et ce, chez toutes les lignées cellulaires analysées (figures 29A+B). Cela nous permet donc de confirmer la spécificité du traitement LY, puisqu'il n'a aucun effet sur les niveaux d'activation de la kinase FAK qui se trouve en aval de sa cible.

Figure 29. L'inhibition de la PI3-K ne provoque aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p125^{FAK} chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 30 μ M de LY294002 (LY ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine FAK a été immunoprécipitée (IP : FAK) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 μ l/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active de FAK (WB : p^{Tyr397}p125^{FAK}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine FAK (WB : p125^{FAK}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes.

A



B

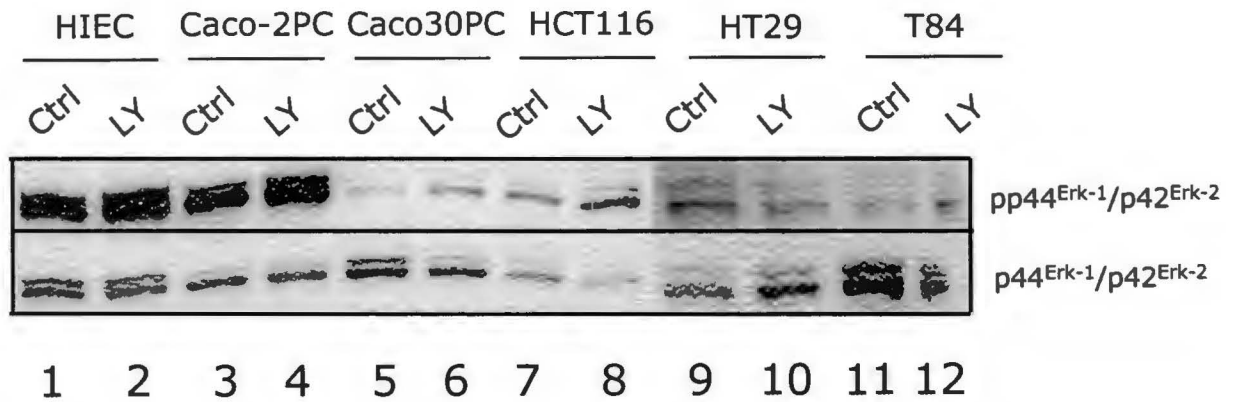


3.4 Effet de l'inhibition de la PI3-K sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal.

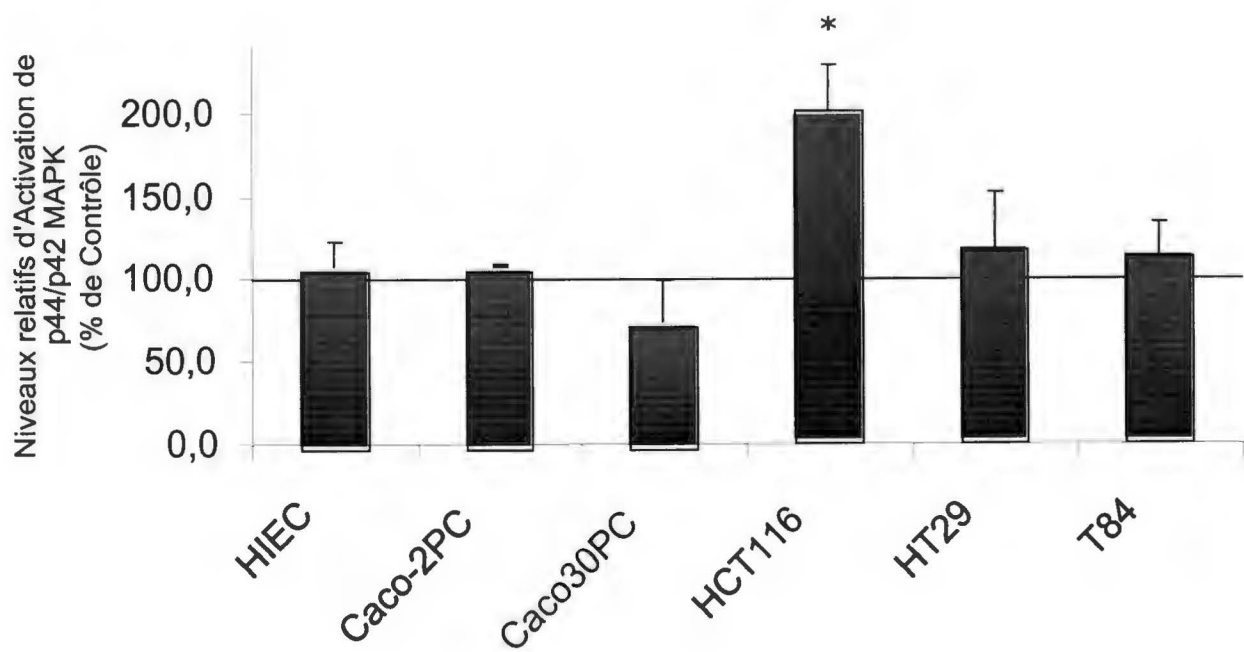
Dans un deuxième temps, nous nous sommes à nouveau assurés de la spécificité de l'inhibiteur LY, mais cette fois, nous avons choisi une cible située dans une voie de signalisation parallèle. Nous avons donc vérifié si l'inhibition de la PI3-K (LY-30 μ M) pouvait affecter les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2. Cela a été effectué chez les cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC), les cellules différenciées (Caco-2/15 30PC) et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon utilisées (HCT116, HT29 et T84). Les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ne semblent pas être affectés suite à l'inhibition de la PI3-K et ce, chez les cellules HT29 et T84, et tout comme chez les cellules indifférenciées et différenciées (figures 30A+B). Cependant, nos analyses indiquent également une forte modulation à la hausse des niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 suite à l'inhibition de la PI3-K chez les cellules HCT116 (figures 30A+B). Cela nous permet de confirmer la spécificité du traitement LY, puisqu'il n'a aucun effet sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 qui se trouve en parallèle de sa cible, mais chez les cellules HCT116, les analyses pourraient nous laisser croire à un effet compensatoire entre les voies PI3-K/Akt-1 et MEK/Erk chez ces cellules.

Figure 30. L'inhibition de la PI3-K n'induit aucune modulation des niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HT29 et T84, alors qu'elle provoque une hausse chez les cellules HCT116. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 30 μ M de LY294002 (LY ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et les protéines totales (50 μ g/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour les formes actives de Erk-1/Erk-2 (WB : pThr202/pTyr204 p44^{Erk-1}/p42^{Erk-2}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps détectant les protéines Erk-1/Erk-2 (WB : p44^{Erk-1}/p42^{Erk-2}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.05$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B



3.5 Effet de l'inhibition de la PI3-K sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez différentes lignées de cancer colorectal.

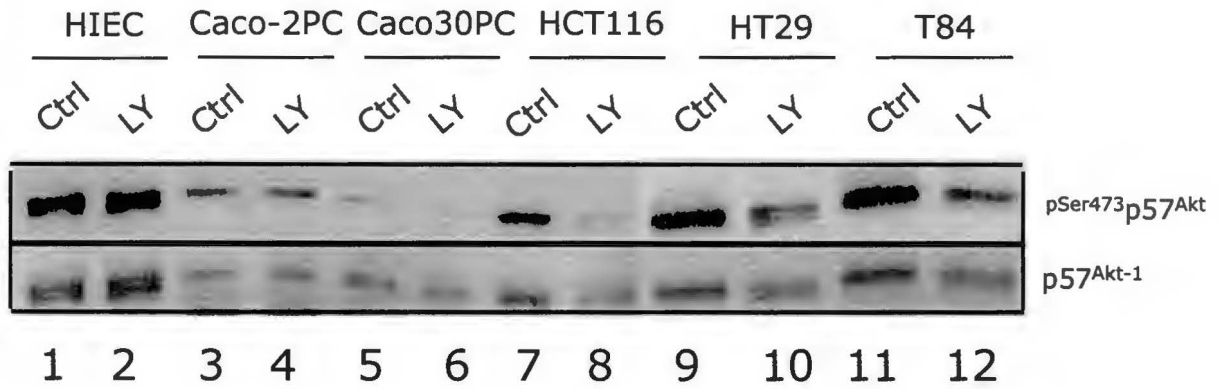
Nous avons vérifié l'efficacité de l'inhibition de la PI3-K par le LY (30 μ M) sur les niveaux d'activation d'Akt-1, un effecteur de la PI3-K (Datta et al., 1999), chez les différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84), ainsi que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux d'activation d'Akt-1 diminuent significativement suite à l'inhibition de la PI3-K et ce, chez tous les types cellulaires utilisés (figure 31A+B), confirmant ainsi que l'inhibition de la PI3-K constitue l'équivalent de l'inhibition de la voie PI3-K/Akt-1.

3.6 Effet de l'anoïkose sur les niveaux d'activation d'Akt-1.

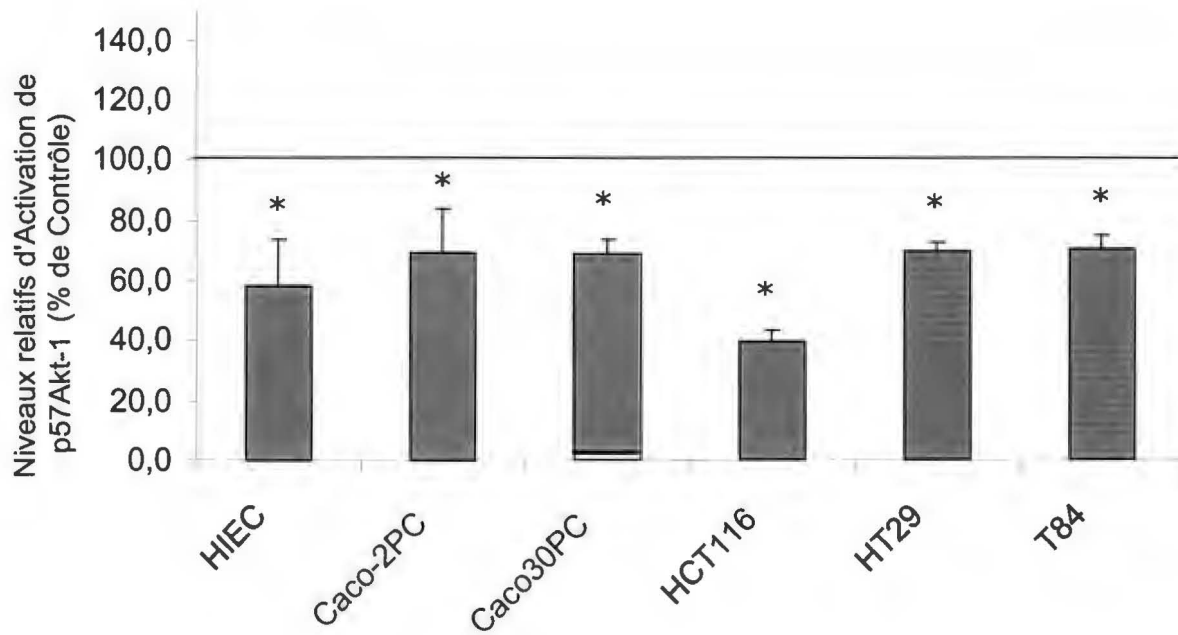
Par la suite, nous avons vérifié l'effet de l'anoïkose (polyHEMA/suspension) sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84) ainsi que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 diminuent significativement suite à l'inhibition de l'adhésion cellulaire chez les cellules HCT116 et HT29, et tout comme chez les cellules tant indifférenciées que différenciées

Figure 31. L'inhibition de la PI3-K induit une baisse significative des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p57^{Akt-1} chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 30 μ M de LY294002 (LY ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine Akt-1 a été immunoprécipitée (IP : Akt-1) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 μ l/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active d'Akt-1 (WB : pSer⁴⁷³p57^{Akt-1}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine Akt-1 (WB : p57^{Akt-1}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.05$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B



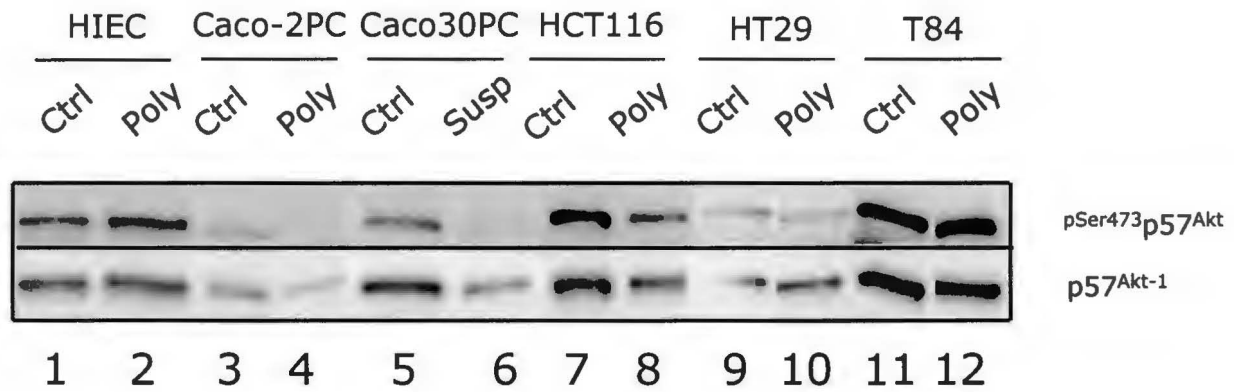
(figure 32A+B). Ces mêmes niveaux d'activation d'Akt-1 ne semblent pourtant pas être affectés, suite à cette même inhibition, chez les cellules T84 où aucune baisse n'est observée (figure 32A+B).

3.7 Effet de l'inhibition de FAK sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez différentes lignées de cancer colorectal.

Finalement, nous avons vérifié l'effet de l'inhibition de FAK (CD-1 μ M) sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84) ainsi que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 diminuent significativement suite à l'inhibition de la kinase FAK chez les cellules HCT116 et HT29, et tout comme chez les cellules tant indifférenciées que différenciées (figure 33A+B). Ces mêmes niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ne semblent pourtant pas être affectés, suite à cette même inhibition, chez les cellules T84 où aucune baisse n'est observée (figure 33A+B). Cela nous permet de confirmer que l'effet de l'inhibition de FAK se répercute sur les niveaux d'activation d'Akt-1. Cependant, il faut noter que l'activation d'Akt-1 chez les cellules T84 semble indépendante de FAK.

Figure 32. La perte d'adhésion cellulaire induit une forte baisse des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p57^{Akt-1} chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) et gardées en suspension ou sur polyhema (susp/poly ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine Akt-1 a été immunoprécipitée (IP : Akt-1) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 μ l/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active d'Akt-1 (WB : p^{Ser473}p57^{Akt-1}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine Akt-1 (WB : p57^{Akt-1}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.02$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B

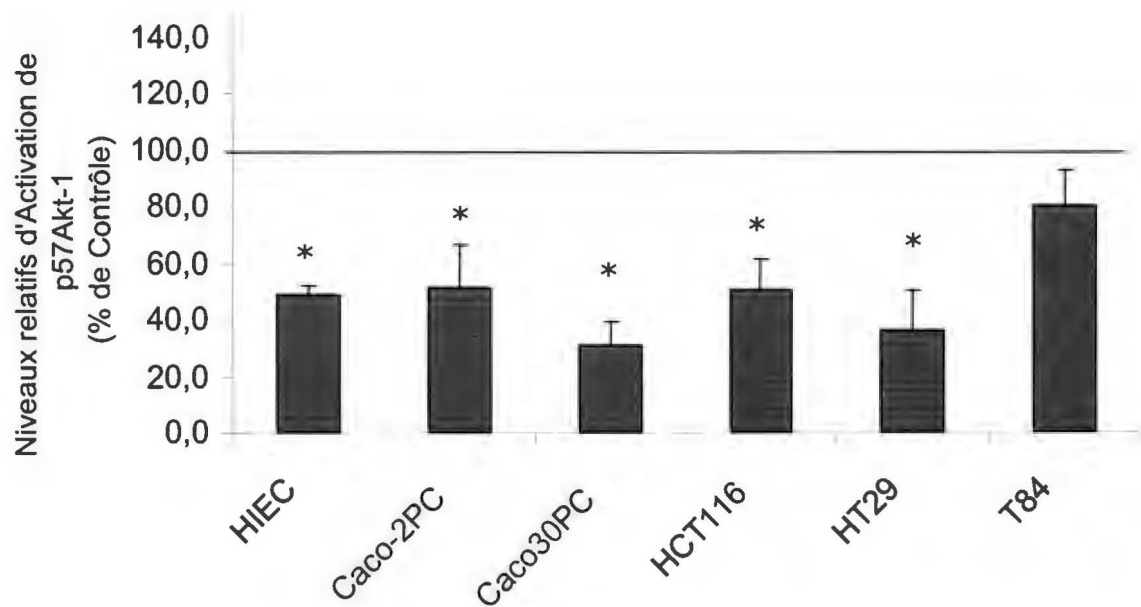
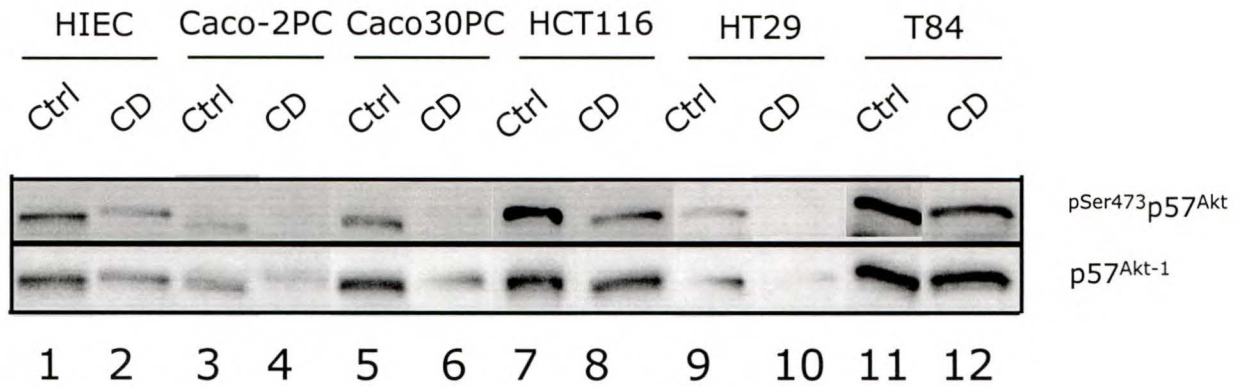
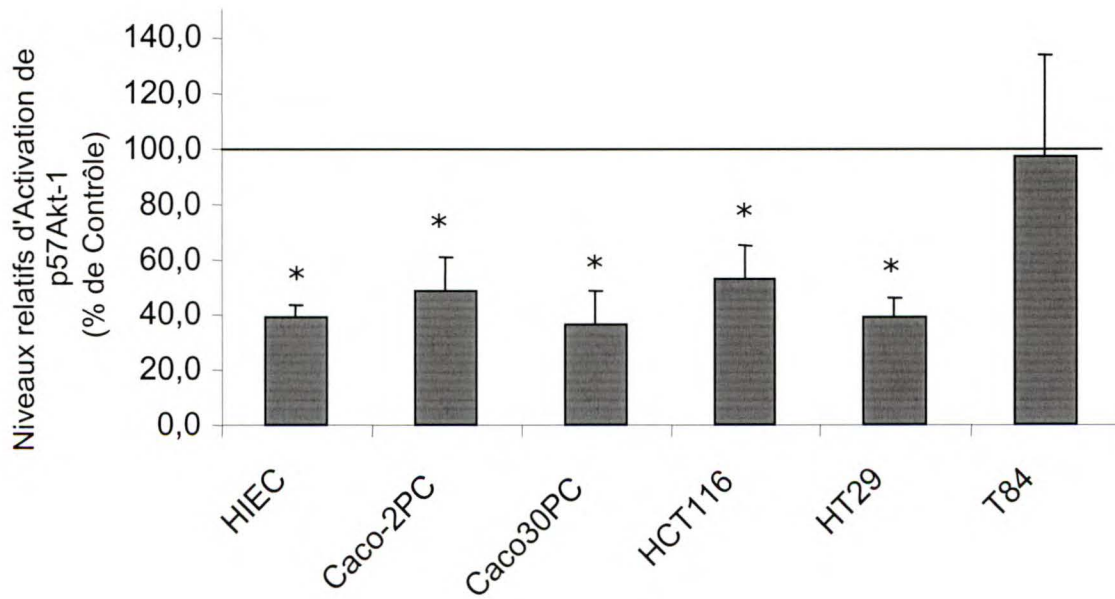


Figure 33. L'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D induit une forte baisse des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules HCT116 et HT29, mais non chez les cellules T84. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p57^{Akt-1} chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec l'addition de 1 μ M de cytochalasine D (CD ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine Akt-1 a été immunoprécipitée (IP : Akt-1) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 μ l/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active d'Akt-1 (WB : pSer⁴⁷³p57^{Akt-1}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine Akt-1 (WB : p57^{Akt-1}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.01$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B

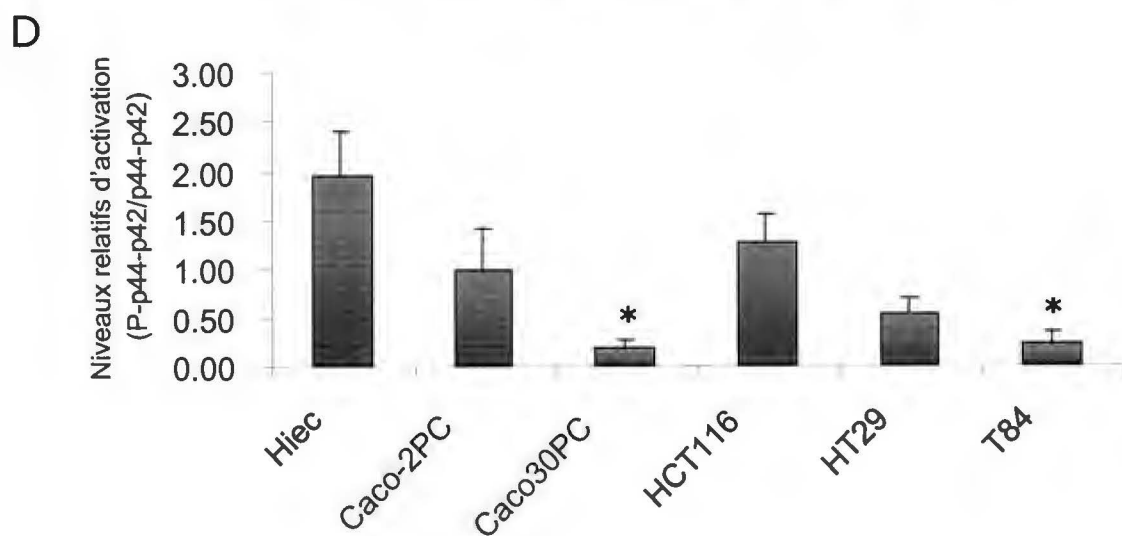
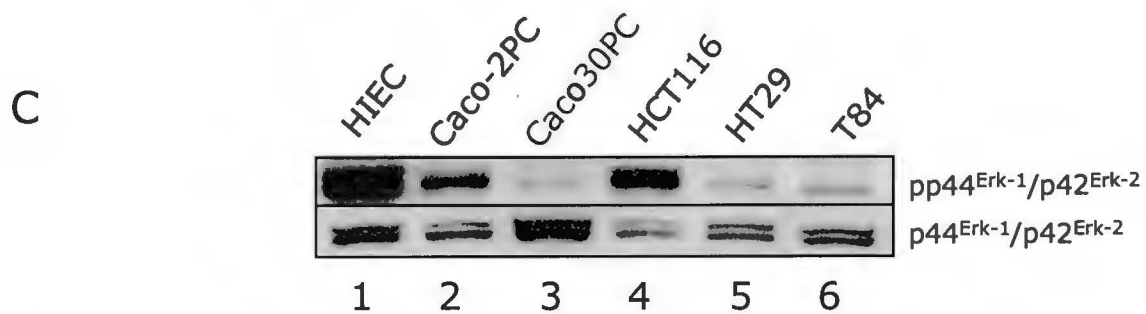
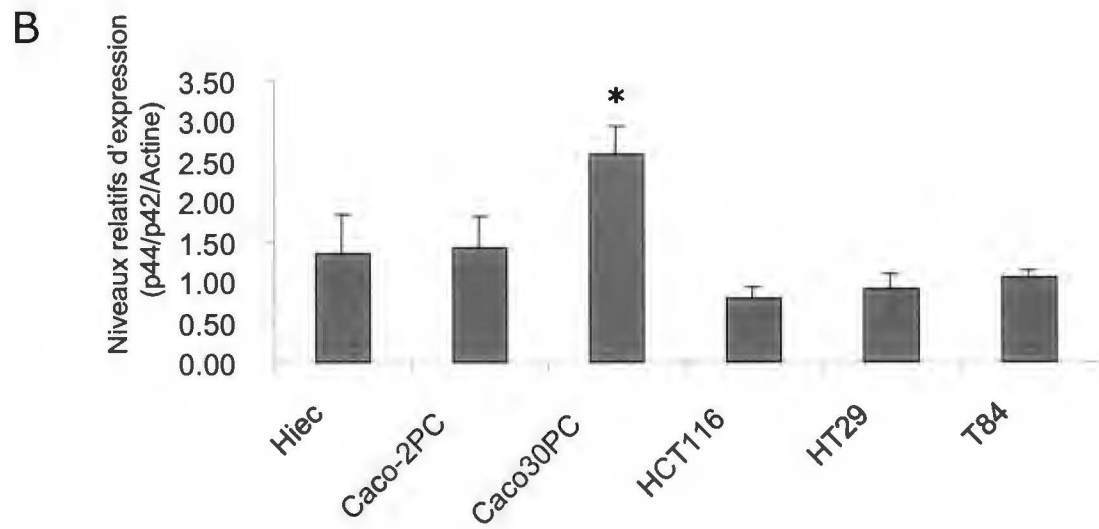
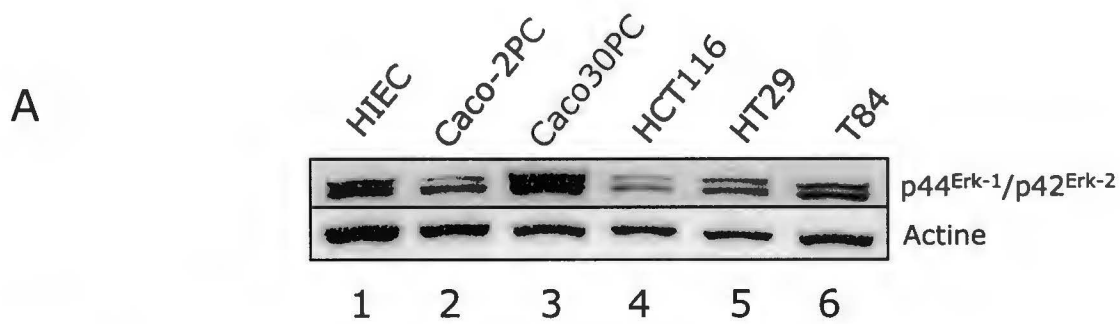


4. La voie MEK/Erk et la survie cellulaire

4.1 Niveaux d'expression et d'activation de base de Erk-1/Erk-2 chez différentes lignées de cancer colorectal.

Dans un premier temps, nous avons analysé par Western Blot les niveaux d'expression et d'activation de base de Erk-1/Erk-2 chez différentes lignées de cancer colorectal, soient les cellules HCT116, HT29 et T84. Ceci a été fait dans le but de comparer ces niveaux avec ceux observés chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Tel que résumé à la figure 34, nous observons que : 1) les niveaux d'expression de base de Erk-1/Erk-2 sont plus élevés chez les cellules différenciées que chez les cellules indifférenciées (figure 34A+B) ; 2) les niveaux d'activation de base de Erk-1/Erk-2 sont plus élevés chez les cellules indifférenciées que chez les cellules différenciées (figure 34C+D) ; 3) les niveaux d'expression de Erk-1/Erk-2 chez toutes nos lignées cancéreuses de côlon (cellules HCT116, HT29 et T84) ressemblent à ceux des cellules indifférenciées (figure 34A+B) ; 4) les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules T84 s'apparentent à ceux des cellules différenciées (figure 34C+D) ; et 5) les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HCT116 et HT29 ressemblent à ceux des cellules indifférenciées (figure 34C+D). Ces observations indiquent que les niveaux d'expression et d'activation de base de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HCT116 et HT29 (ne se différencient/polarisent pas) correspondent à leur degré de dédifférenciation, puisque ces niveaux corrèlent avec ceux des cellules indifférenciées. Ces observations

Figure 34. Les niveaux d'activation de base de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal correspondent à leur degré de dédifférenciation. A : Analyse Western Blot représentative de l'expression de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HIEC (ligne 1), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (ligne 2) et différenciées (30PC) (ligne 3), et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon ; les cellules HCT116 (ligne 4), HT29 (ligne 5) et T84 (ligne 6). Les protéines totales (50 μ g/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour les protéines Erk-1/Erk-2. La détection de l'actine a aussi été analysée pour des raisons de normalisation. B : Niveaux relatifs d'expression de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'expression de Erk-1/Erk-2 ont été déterminés par le ratio de $p44^{\text{Erk-1}}/p42^{\text{Erk-2}}/\text{Actine}$. C : Analyse Western Blot représentative de l'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées utilisées en A. Les protéines totales ont été séparées comme représenté en A et ont été détectées avec des anticorps spécifiques de la forme active de Erk-1/Erk-2 ($pp44^{\text{Erk-1}}/p42^{\text{Erk-2}}$), phospho-Thr202/Tyr204, et des protéines Erk-1/Erk-2 ($p44^{\text{Erk-1}}/p42^{\text{Erk-2}}$). D : Niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été déterminés par le ratio de $pp44^{\text{Erk-1}}/p42^{\text{Erk-2}}/p44^{\text{Erk-1}}/p42^{\text{Erk-2}}$. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) cultures séparées et indépendantes pour chaque lignée cellulaire analysée. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.05$) en comparaison aux Caco-2/15 -2PC.



indiquent également que les niveaux d'activation, mais non les niveaux d'expression de base de Erk-1/Erk-2 chez les cellules T84 (se polarisent), correspondent à leur degré de dédifférenciation, puisque ces niveaux corrélerent avec ceux des cellules épithéliales intestinales différenciées.

4.2 Impact de l'inhibition de MEK sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal.

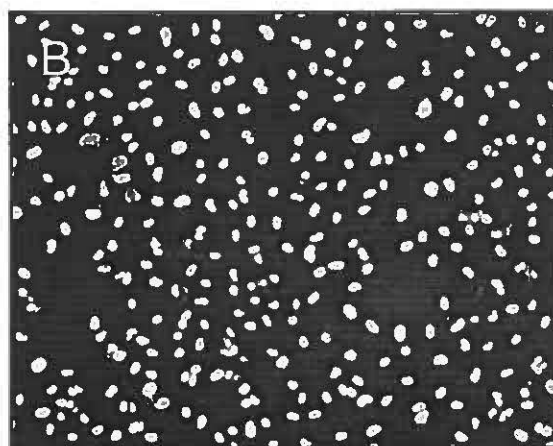
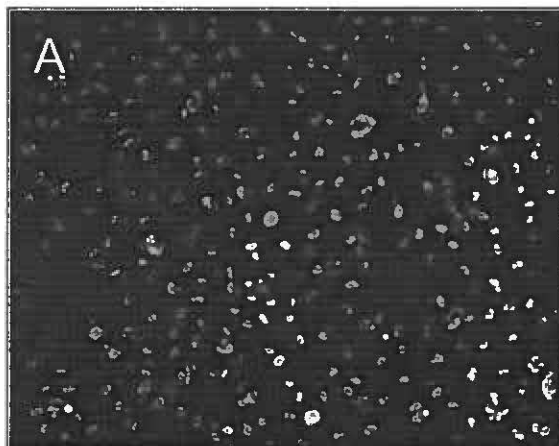
Nous avons vérifié l'impact de l'inhibition de MEK par le PD98059 (20 μ M) sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal utilisées (HCT116, HT29 et T84). À des fins de comparaison, cela a également été vérifié chez des cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et des cellules différenciées (Caco-2/15 30PC). Un traitement à la génistéine (300 μ M) a aussi été utilisé comme contrôle positif d'apoptose. L'induction de l'apoptose a été visualisée par TUNEL *in situ*. Nous observons que : 1) l'absence de sérum n'induit pas l'apoptose chez la plupart de nos types cellulaires, excepté chez nos cellules T84 qui semblent être plus sensibles à l'absence de sérum (figures 35A+B, 36A+B, 37A+B, 38A+B, 39A+B, 40A+B) ; 2) le traitement à la génistéine, comme nous nous y attendions (Gauthier et al., 2001a), induit fortement l'apoptose chez tous les types cellulaires utilisés (figures 35C+D, 36C+D, 37C+D, 38C+D, 39C+D, 40C+D) ; 3) l'exposition au PD98059 n'induit pas l'apoptose chez les cellules indifférenciées (figures 35E+F, 36E+F et 41), et comme nous nous y attendions (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004) ; 4) cependant, le PD induit l'apoptose chez les cellules différenciées (figures 37E+F et 41), comme nous nous y attendions (Gauthier

Figure 35. Les cellules HIEC sont insensibles à l'inhibition de MEK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de PD98059 (+PD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 10X.

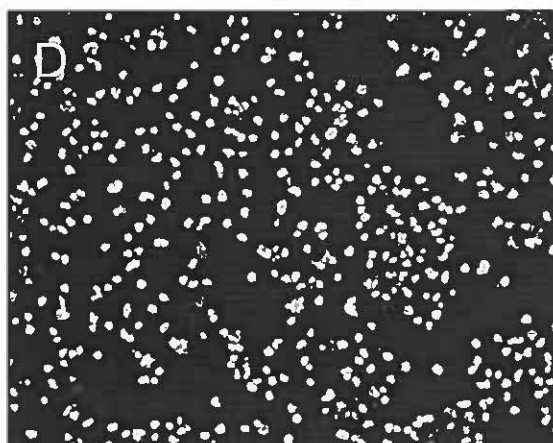
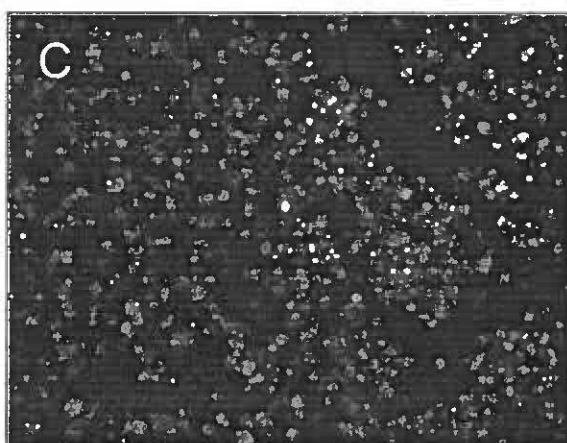
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+PD

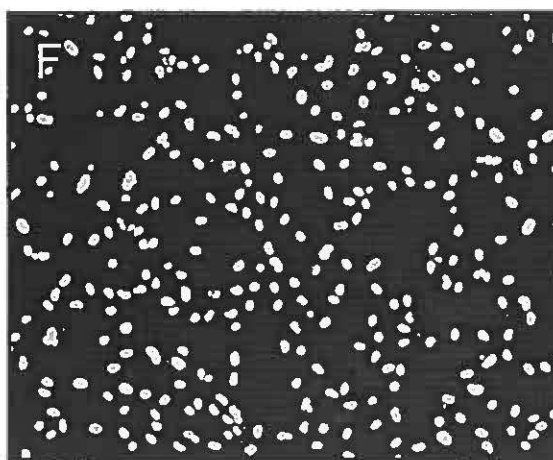
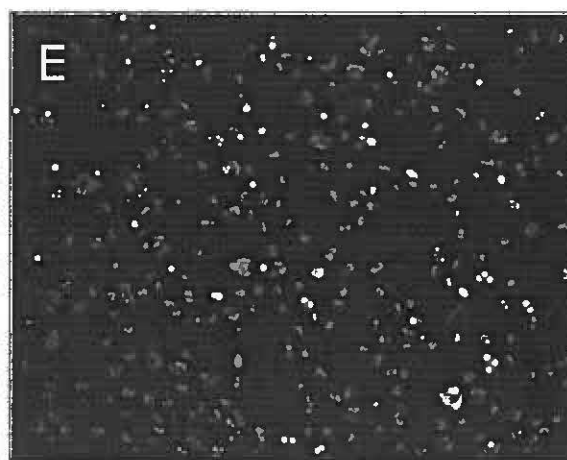
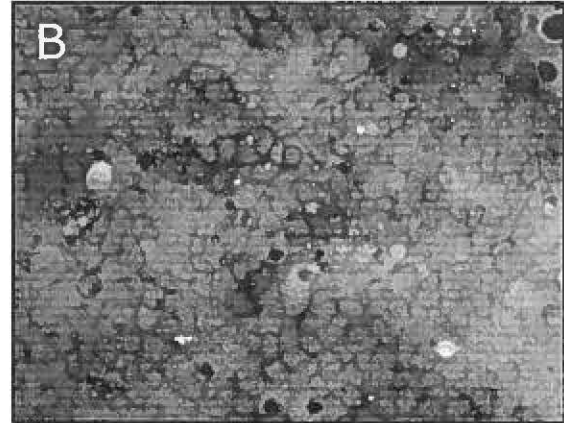
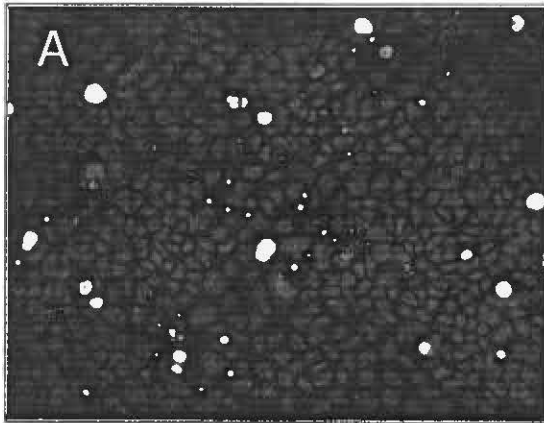


Figure 36. Les cellules Caco-2PC sont insensibles à l'inhibition de MEK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 -2PC (sous confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de PD98059 (+PD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

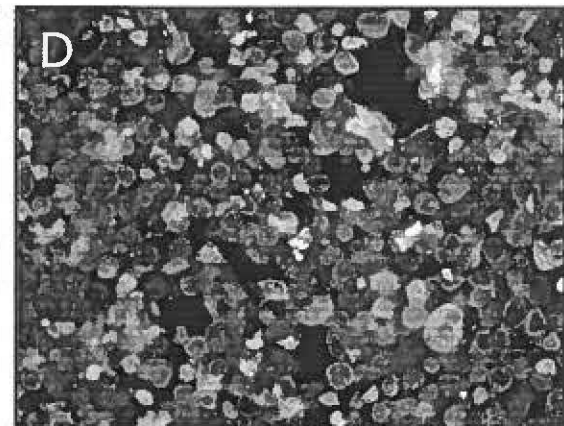
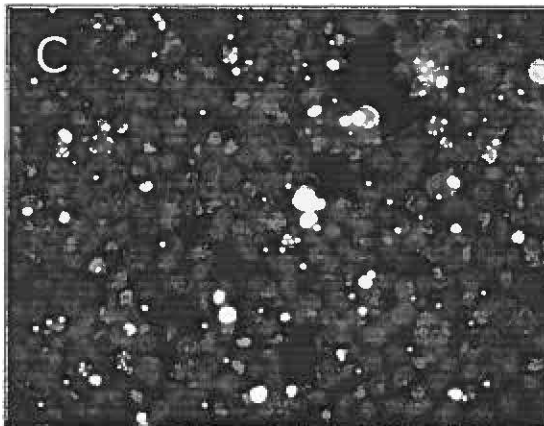
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+PD

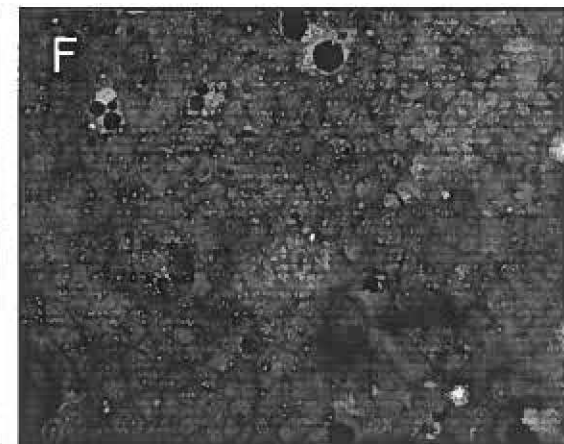
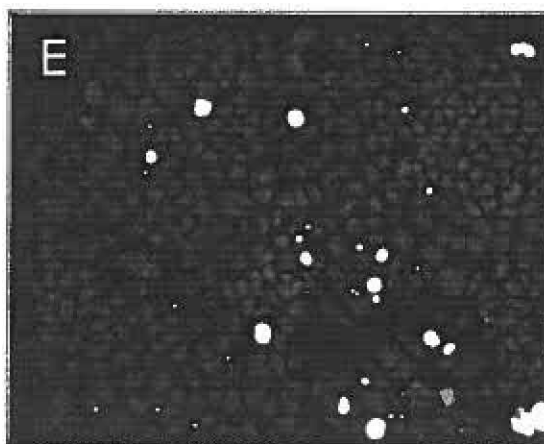
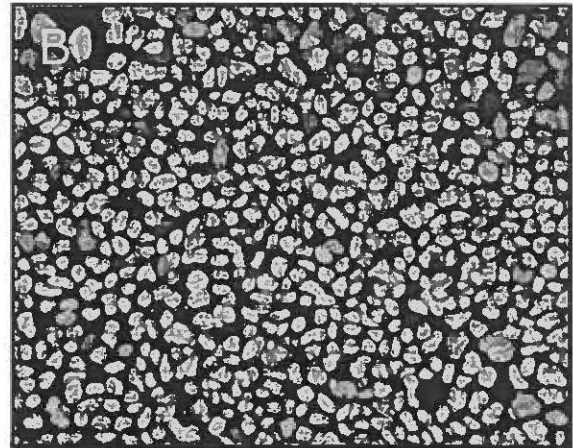
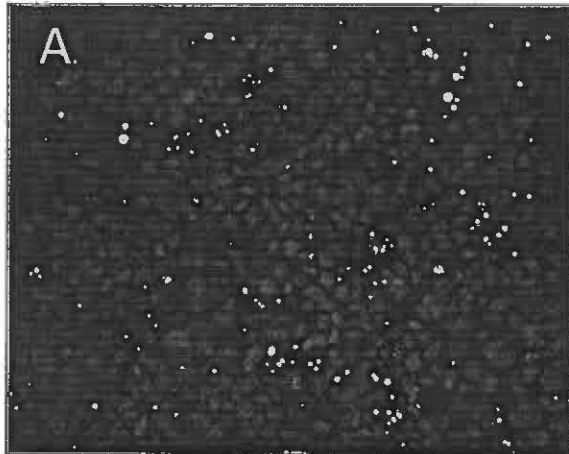


Figure 37. Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de MEK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 30PC (30 jours post-confluence et différenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de PD98059 (+PD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

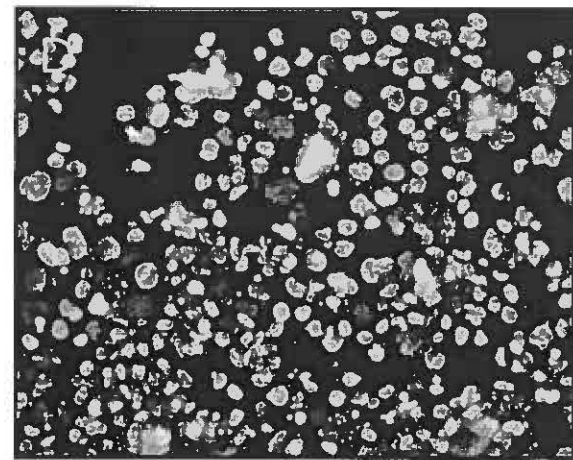
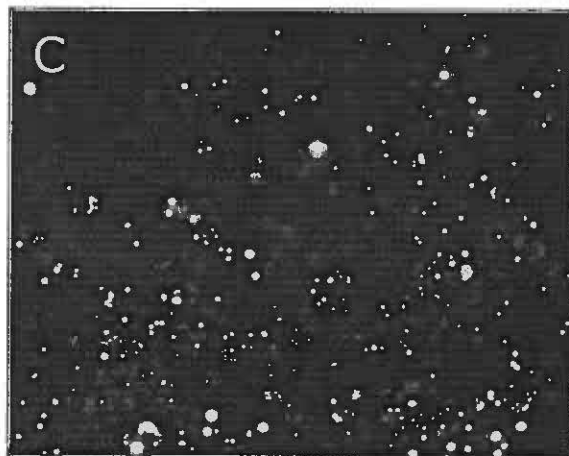
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+PD

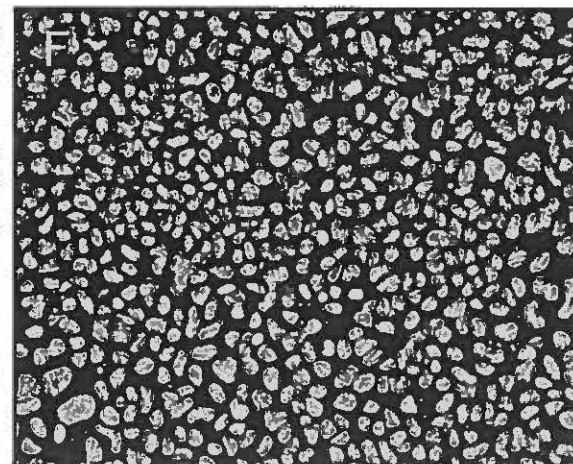
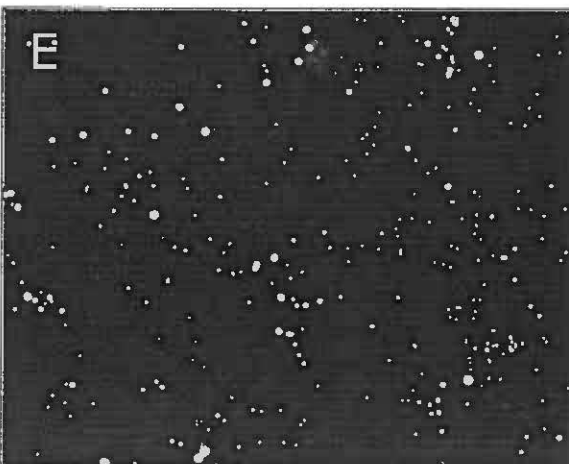


Figure 38. Les cellules HCT116 entrent en apoptose suite à l'inhibition de MEK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HCT116 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de PD98059 (+PD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

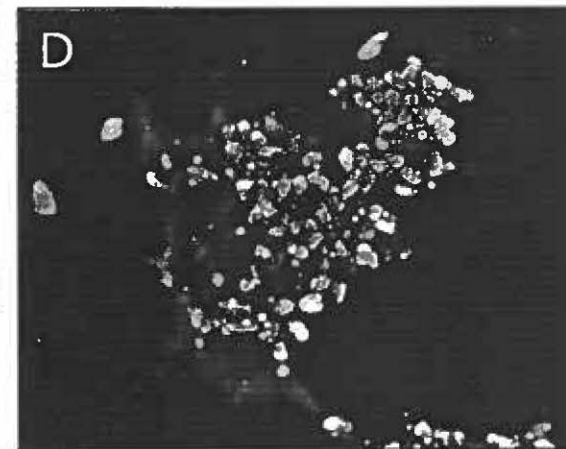
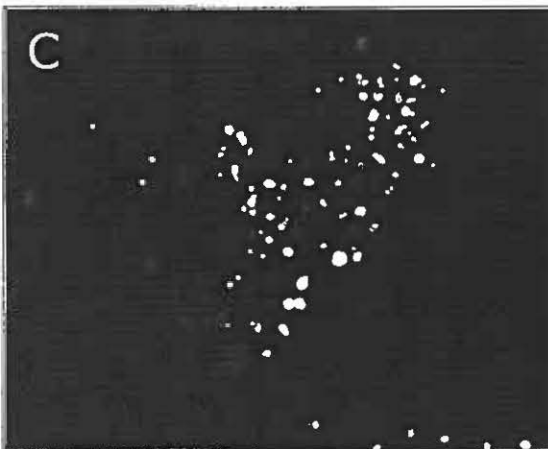
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+PD

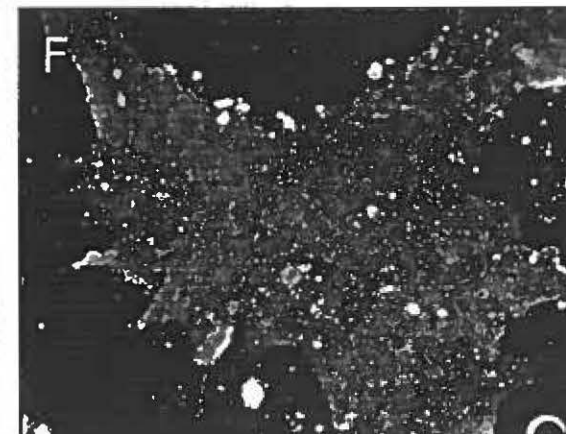
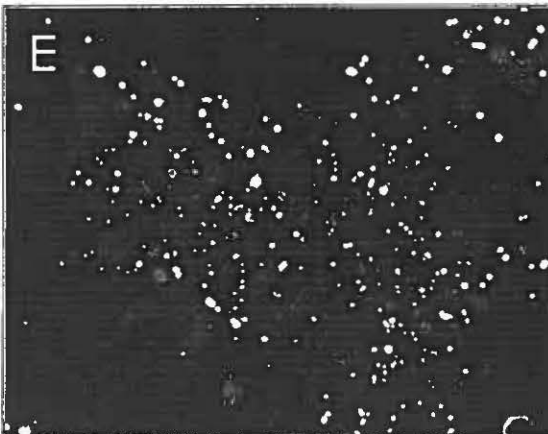
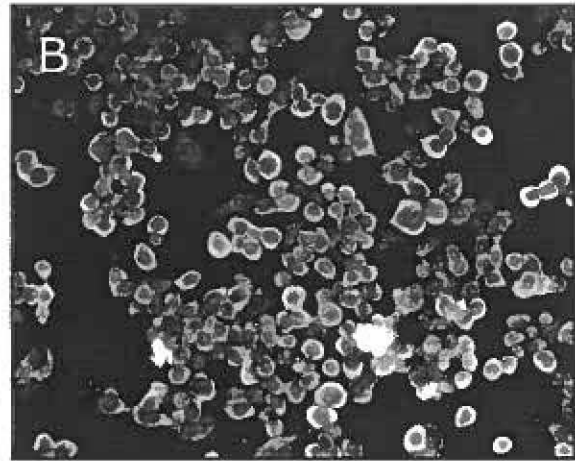
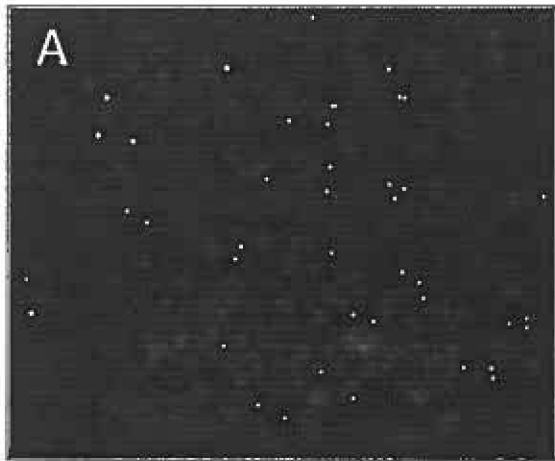


Figure 39. Les cellules HT29 entrent en apoptose suite à l'inhibition de MEK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HT29 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de PD98059 (+PD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

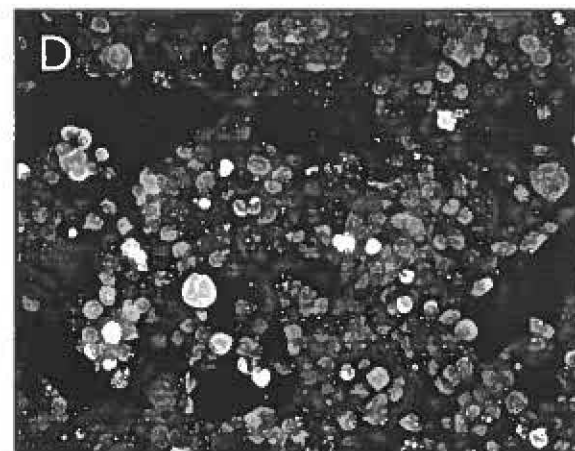
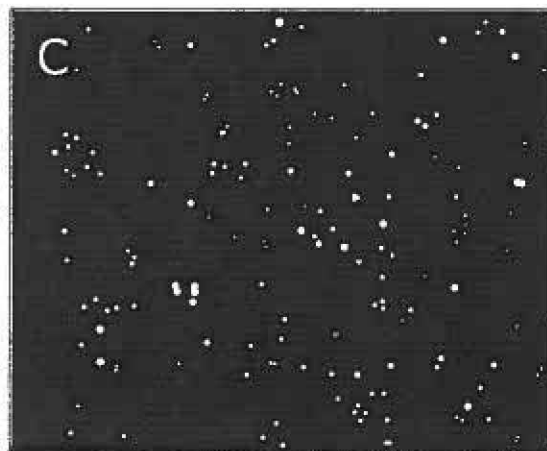
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+PD

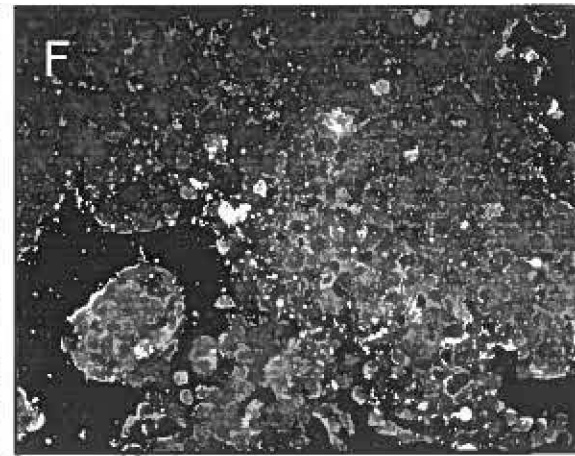
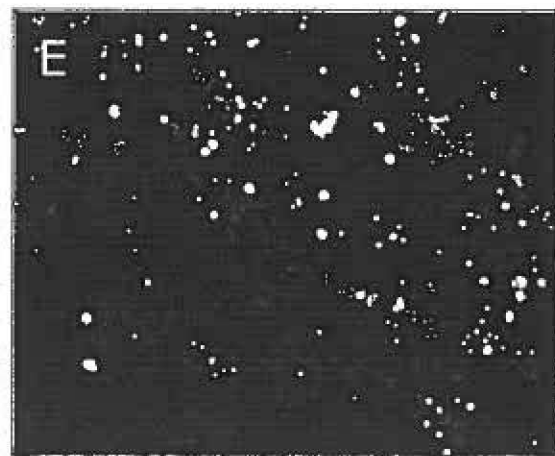
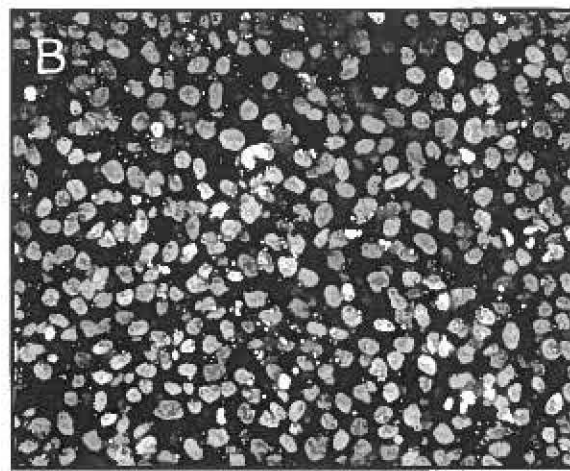
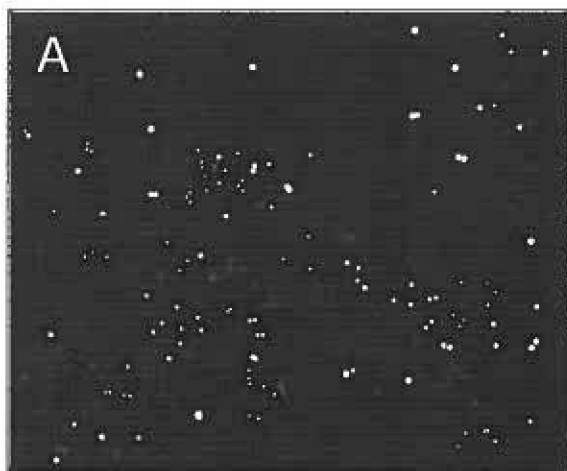


Figure 40. Les cellules T84 entrent en apoptose suite à l'inhibition de MEK. Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules T84 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de PD98059 (+PD ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

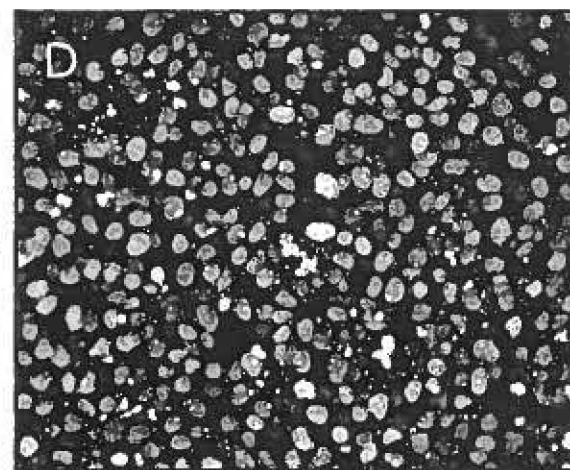
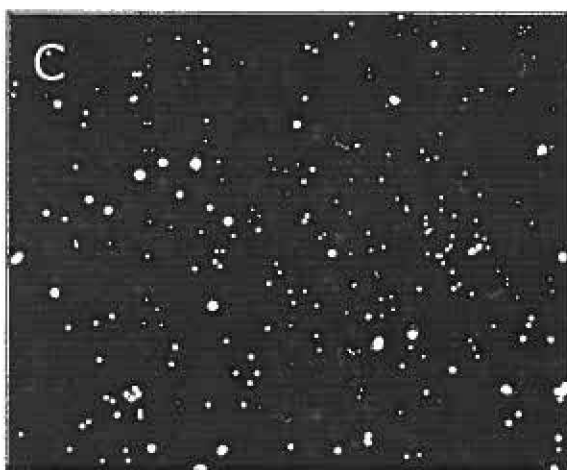
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+PD

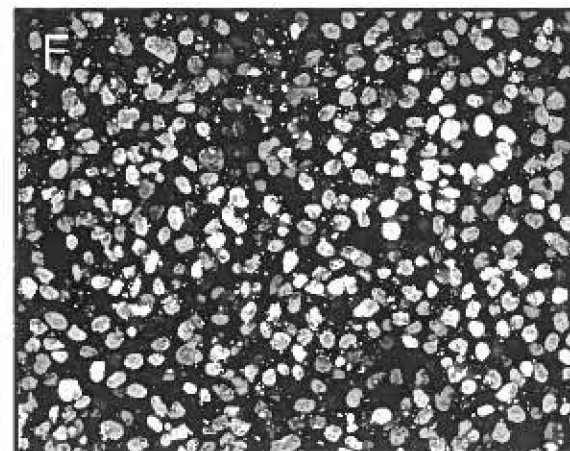
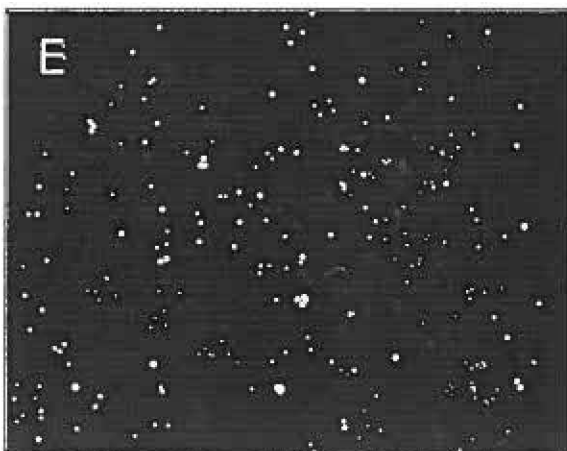
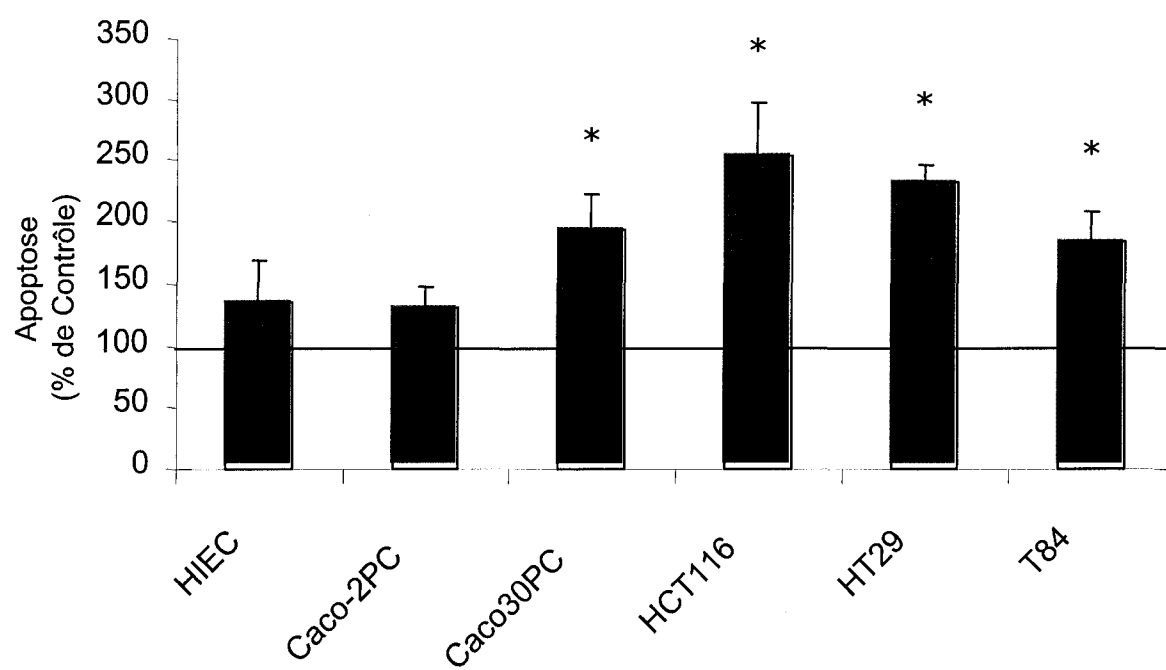


Figure 41. L'inhibition de MEK induit l'apoptose chez les cellules HCT116, HT29 et T84. Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) et différenciées (30PC) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84, ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle) ou en présence de 20 μ M de PD98059 (PD), qui est un inhibiteur affectant spécifiquement l'activation de MEK. Des TUNELs *in situ* ont été faits afin d'établir l'index relatif d'apoptose, s'exprimant comme le nombre de cellules apoptotiques pour le traitement PD par rapport au contrôle X100 (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules a été compté pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.001$) comparée aux contrôles sans sérum.



et al., 2001a) ; et 5) l'exposition au PD induit l'apoptose chez toutes les lignées cancéreuses de côlon utilisées (Figures 38E+F, 39E+F, 40E+F et 41). Ces résultats indiquent que les cellules HCT116 et HT29 (qui ne se différencient pas) ainsi que les cellules T84 (qui se polarisent) exhibent des susceptibilités à l'apoptose qui sont similaires à celles des cellules épithéliales intestinales différenciées lors de l'inhibition de MEK.

Tableau 6. L'inhibition de MEK induit l'apoptose chez les cellules HCT116, HT29 et T84.

Lignées Cellulaires	(a) Contrôle Sans Sérum (% de cellules apoptotiques)	Génistéine (300 μ M) (% de cellules apoptotiques)	PD98059 (20 μ M) (% de cellules apoptotiques)	(c) Index relatif (% de Contrôle)
HIEC	(b) 5.0 ± 2.5	18.4 ± 3.3	7.7 ± 3.5	134.4 ± 34.6
Caco-2PC	9.8 ± 1.8	31.3 ± 2.3	12.8 ± 2.3	129.7 ± 18.5
Caco30PC	13.0 ± 1.8	34.5 ± 5.6	24.9 ± 4.1	$192.3 \pm 29.7 *$
HCT116	12.2 ± 2.1	46.0 ± 6.8	27.8 ± 5.5	$253.7 \pm 42.6 *$
HT29	10.2 ± 1.2	21.0 ± 3.2	24.3 ± 1.6	$230.7 \pm 16.6 *$
T84	20.6 ± 1.3	42.2 ± 3.1	38.4 ± 4.3	$182.7 \pm 24.5 *$

Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (sous confluentes) et différenciées (30 jours post-confluence) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84 (a) ont été maintenues 48h dans un milieu DMEM sans sérum (contrôle), ou en présence de 300 μ M de génistéine, qui est un inhibiteur à large spectre des tyrosines kinases, ou en présence de 20 μ M de PD98059 (PD), qui est un inhibiteur de MEK. (b) Des TUNEL *in situ* ont été faits afin d'établir le pourcentage de cellules apoptotiques, s'exprimant comme étant le nombre de cellules apoptotiques sur le nombre de cellules totales comptées, obtenu pour chaque traitement. (c) L'index relatif a été établi, s'exprimant comme le pourcentage de cellules apoptotiques pour le traitement PD par rapport au contrôle (% de

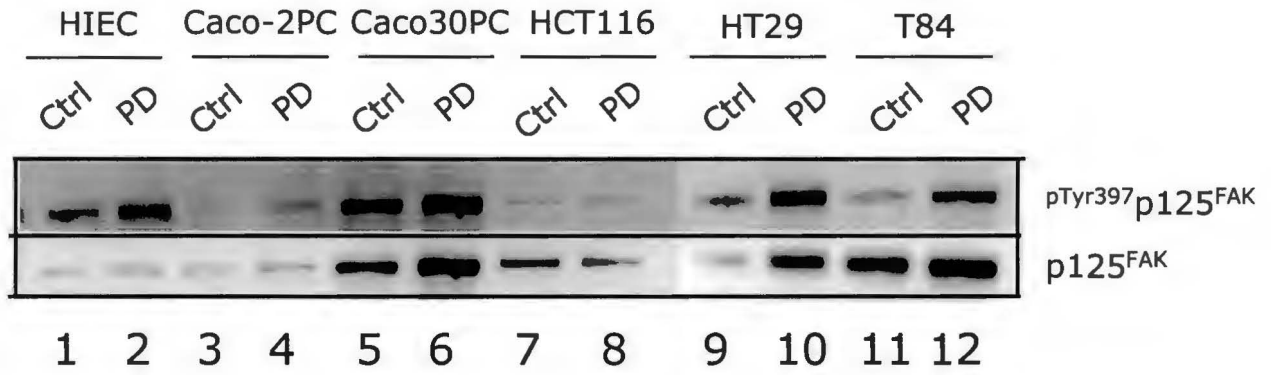
contrôle). Un minimum de 300 cellules ont été comptées pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.001$) comparée aux contrôles sans sérum.

4.3 Effet de l'inhibition de MEK sur les niveaux d'activation de FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal.

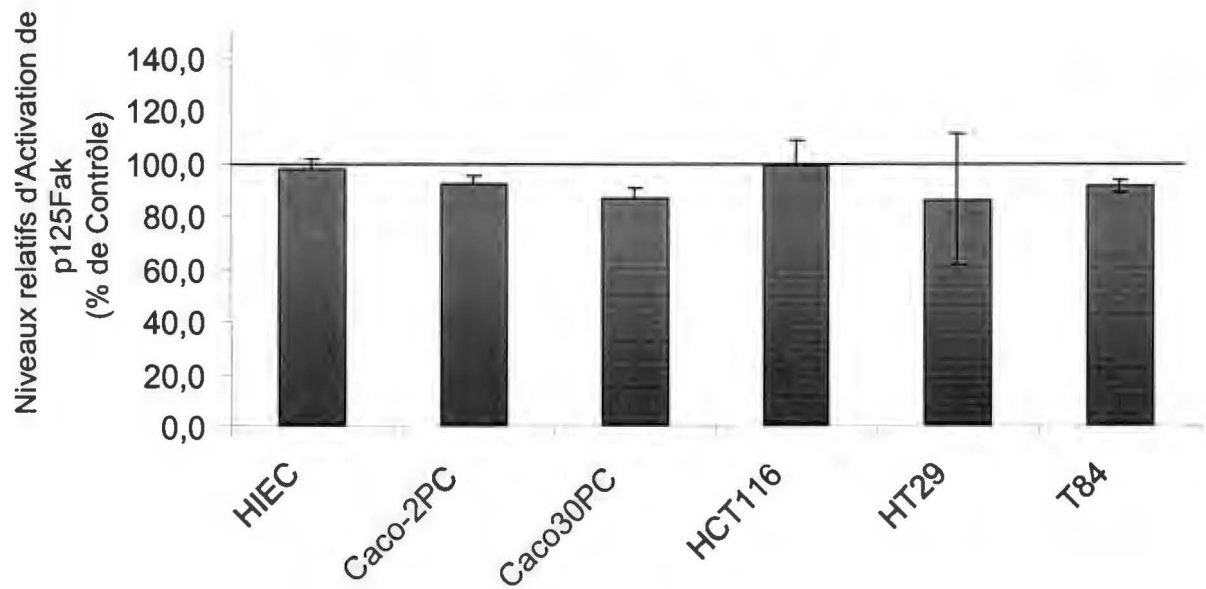
En premier lieu, nous nous sommes assurés de la spécificité de l'inhibiteur pharmacologique PD. Donc, nous avons vérifié si l'inhibition de MEK (20 μ M), qui est situé en aval de FAK dans la cascade de signalisation, pouvait affecter les niveaux d'activation de p125^{FAK}. Cela a été effectué chez les cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC), les cellules différenciées (Caco-2/15 30PC) et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon utilisées (HCT116, HT29 et T84). Les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation de FAK ne semblent pas être affectés suite à l'inhibition de MEK et ce, chez toutes les lignées cellulaires analysées (figure 42A+B). Cela nous permet donc de confirmer la spécificité du traitement PD, puisqu'il n'a aucun effet sur les niveaux d'activation de la kinase FAK qui se trouve en aval de sa cible.

Figure 42. L'inhibition de MEK ne provoque aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p125^{FAK} chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 20 μ M de PD98059 (PD ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine FAK a été immunoprécipitée (IP : FAK) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 μ l/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active de FAK (WB : p^{Tyr397}p125^{FAK}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine FAK (WB : p125^{FAK}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de FAK ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes.

A



B



4.4 Effet de l'inhibition de MEK sur les niveaux d'activation d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal.

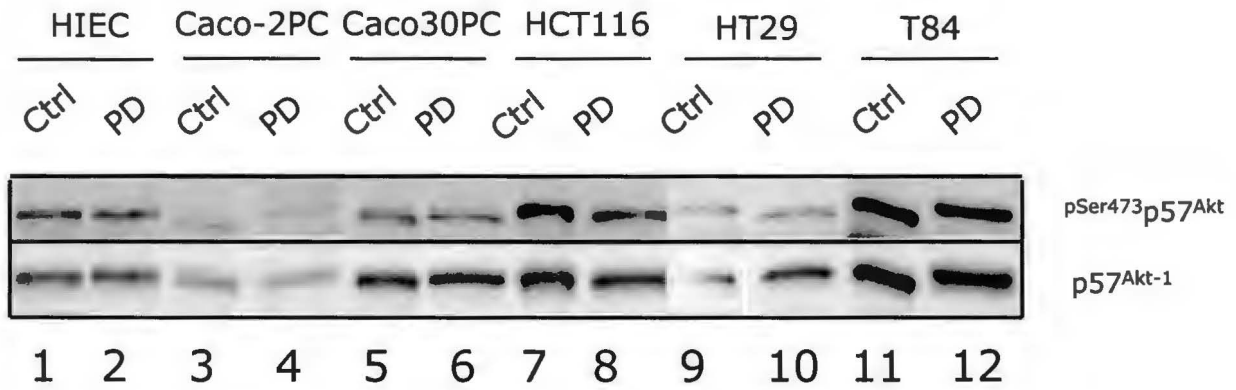
Dans un deuxième temps, nous nous sommes à nouveau assurés de la spécificité de l'inhibiteur PD, mais cette fois, nous avons choisi une cible située dans une voie de signalisation parallèle. Nous avons donc vérifié si l'inhibition de MEK (PD-20 μ M) pouvait affecter les niveaux d'activation d'Akt-1. Cela a été effectué chez les cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC), les cellules différenciées (Caco-2/15 30PC) et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon utilisées (HCT116, HT29 et T84). Les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ne semblent pas être affectés suite à l'inhibition de MEK et ce, chez toutes les lignées cancéreuses de côlon analysées (HCT116, HT29 et T84), et tout comme chez les cellules tant indifférenciées que différenciées (figure 43A+B). Cela nous permet de confirmer la spécificité du traitement PD, puisqu'il n'a aucun effet sur les niveaux d'activation d'Akt-1 qui se trouve en parallèle de sa cible.

4.5 Effet de l'inhibition de MEK sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal.

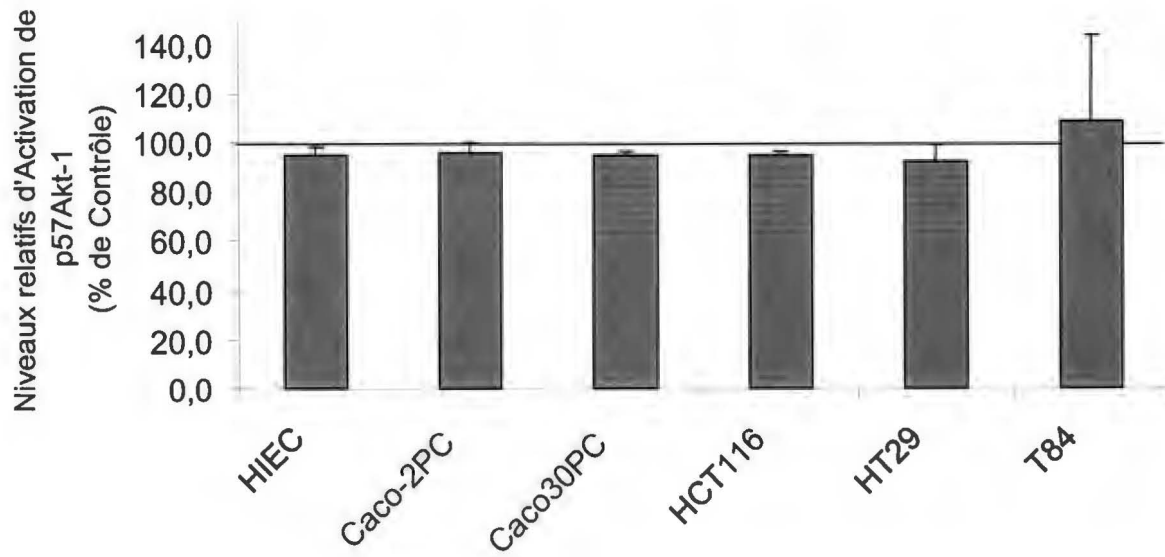
Nous avons vérifié l'efficacité de l'inhibition de MEK par le PD (20 μ M) sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2, des effecteurs de MEK (Kyriakis et Avruch, 2001), chez les différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84), ainsi que chez

Figure 43. L'inhibition de MEK n'induit aucune modulation des niveaux d'activation d'Akt-1 chez les cellules HCT116, HT29 et T84. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de $p57^{\text{Akt-1}}$ chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 20 μM de PD98059 (PD ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et la protéine Akt-1 a été immunoprécipitée (IP : Akt-1) avec un anticorps spécifique. Les protéines totales immunoprécipitées (30 $\mu\text{l/puit}$) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique reconnaissant la forme active d'Akt-1 (WB : $p^{\text{Ser473}}p57^{\text{Akt-1}}$). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps utilisé pour l'IP afin de détecter la protéine Akt-1 (WB : $p57^{\text{Akt-1}}$). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes.

A



B



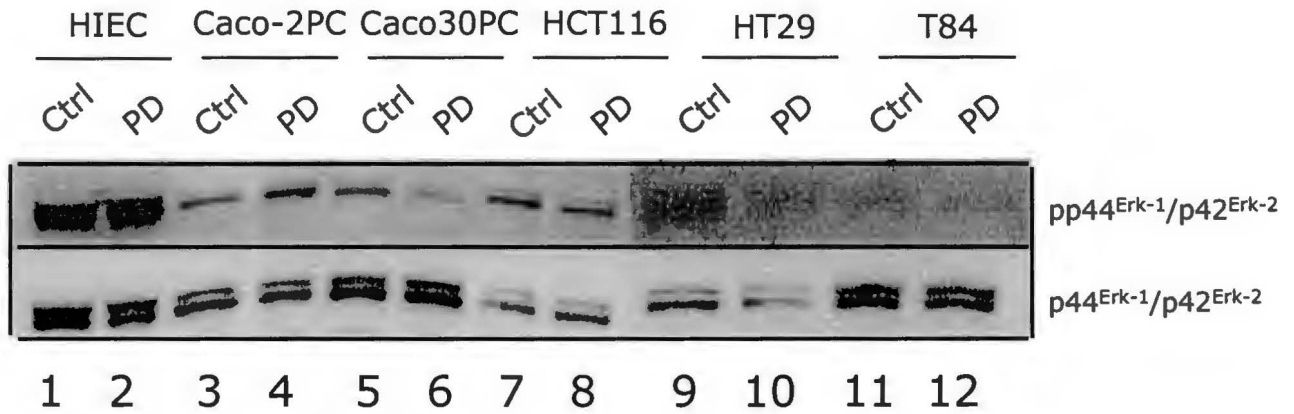
les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 diminuent significativement suite à l'inhibition de MEK et ce, chez tous les types cellulaires utilisés (figure 44A+B), confirmant ainsi que l'inhibition de MEK constitue l'équivalent de l'inhibition de la voie MEK/Erk.

4.6 Effet de l'inhibition de FAK sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez différentes lignées de cancer colorectal.

Finalement, nous avons vérifié l'effet de l'inhibition de FAK (CD-1 μ M) sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84) ainsi que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 diminuent significativement suite à l'inhibition de la kinase FAK chez toutes les lignées cancéreuses de côlon analysées (HCT116, HT29 et T84), et tout comme chez les cellules tant indifférenciées que différenciées (figure 45A+B). Cela nous permet de confirmer que l'effet de l'inhibition de FAK se répercute sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2. Cela nous laisse également croire que l'activation de Erk-1/Erk-2 serait dépendante de FAK.

Figure 44. L'inhibition de MEK induit une baisse significative des niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 20 μ M de PD98059 (PD ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et les protéines totales (50 μ g/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour les formes actives de Erk-1/Erk-2 (WB : pThr202/pTyr204 p44^{Erk-1}/p42^{Erk-2}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps détectant les protéines Erk-1/Erk-2 (WB : p44^{Erk-1}/p42^{Erk-2}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.05$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B

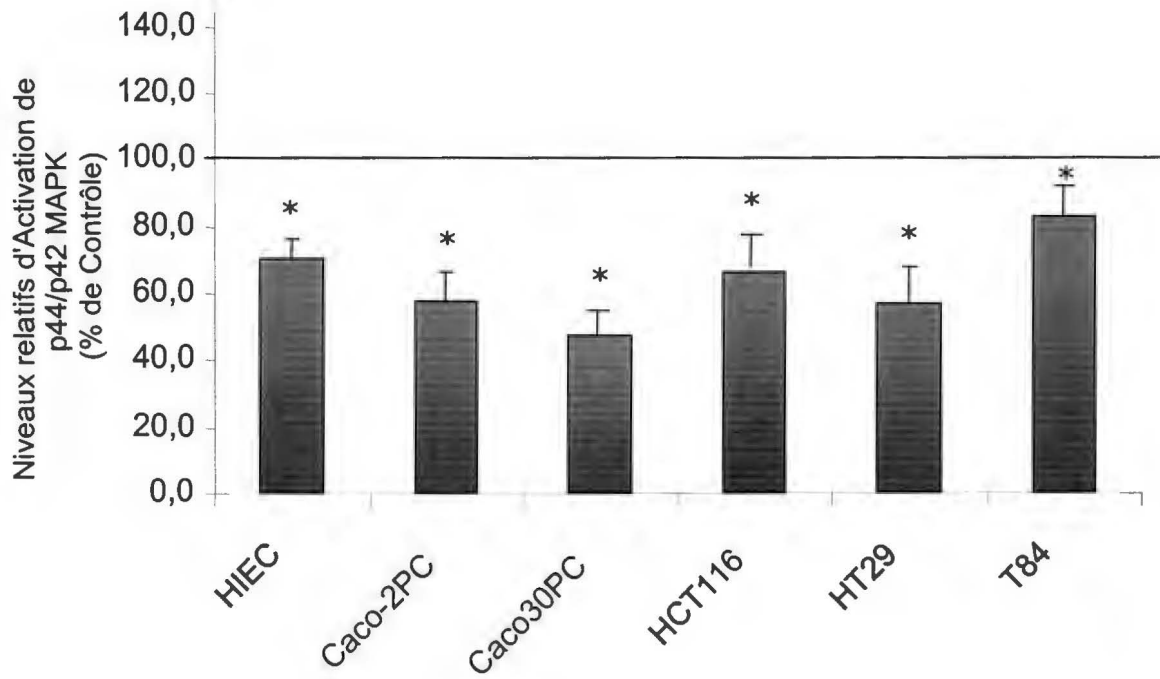
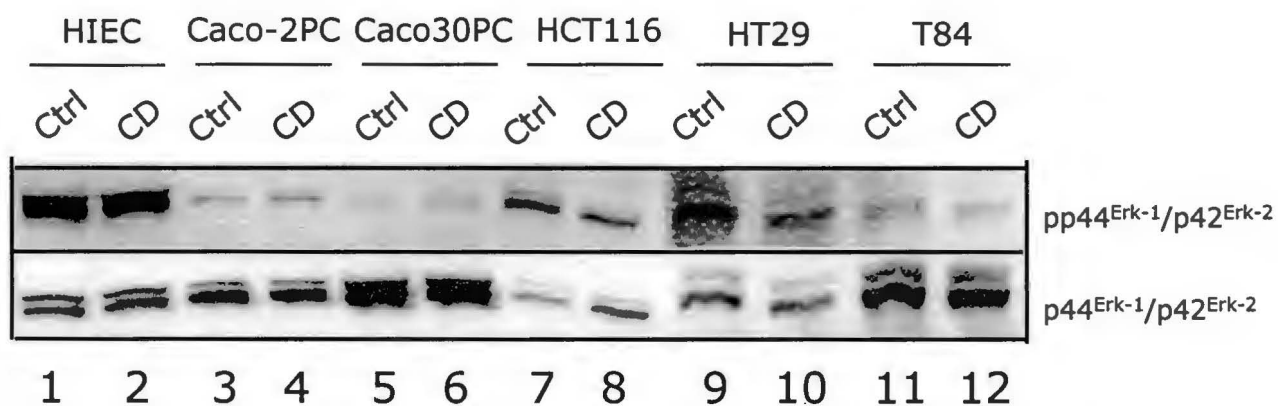
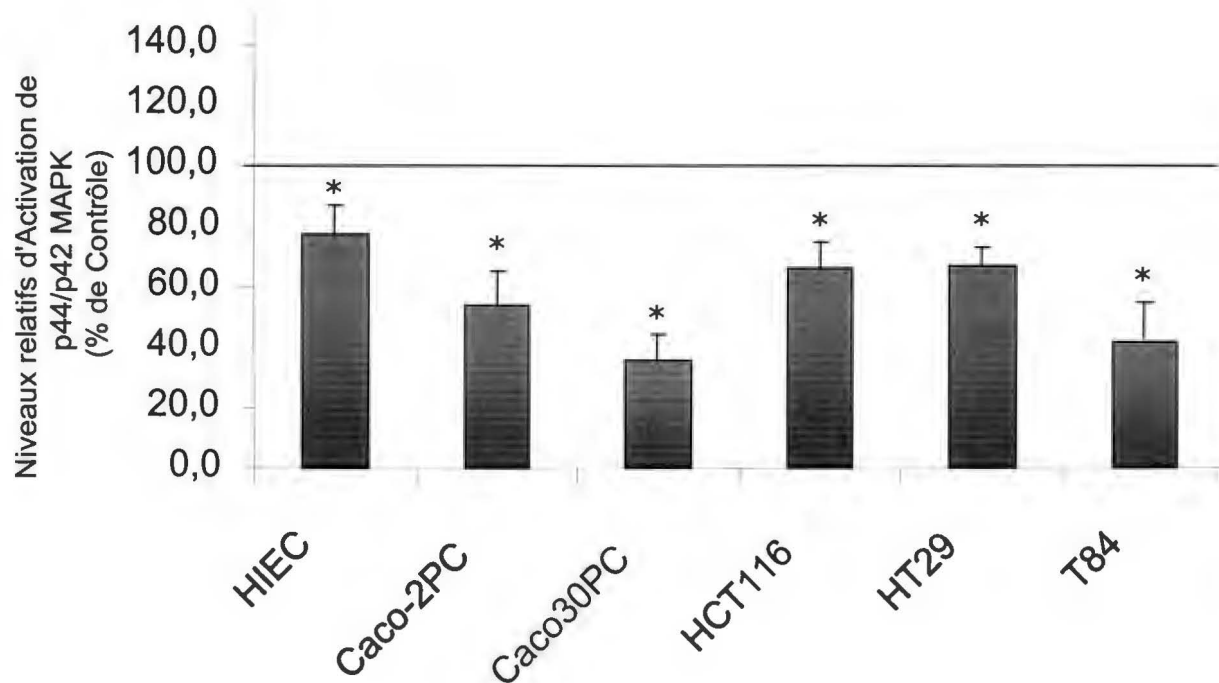


Figure 45. L'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D induit une baisse significative des niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 1 μ M de cytochalasine D (CD ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et les protéines totales (50 μ g/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour les formes actives de Erk-1/Erk-2 (WB : pThr202/pTyr204 p44^{Erk-1}/p42^{Erk-2}). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps détectant les protéines Erk-1/Erk-2 (WB : p44^{Erk-1}/p42^{Erk-2}). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.05$) entre les cultures traitées et les cultures contrôles.

A



B

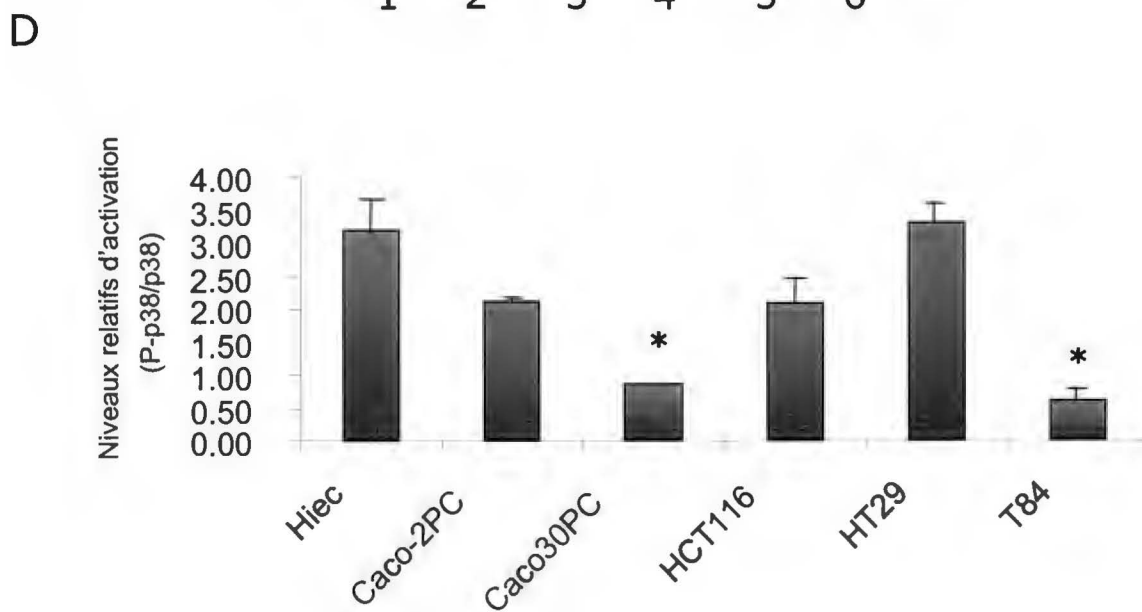
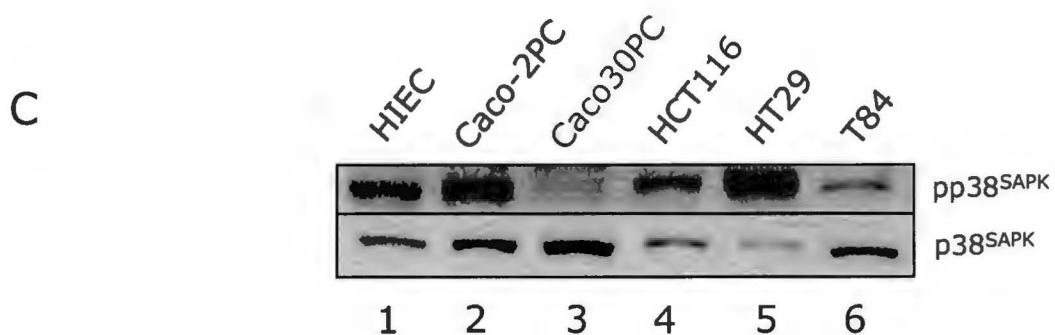
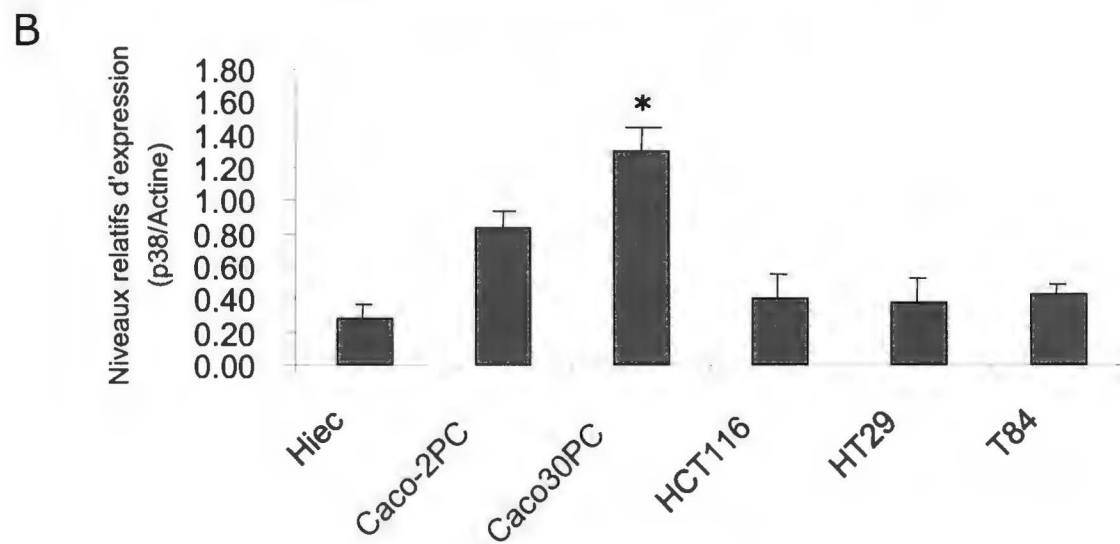
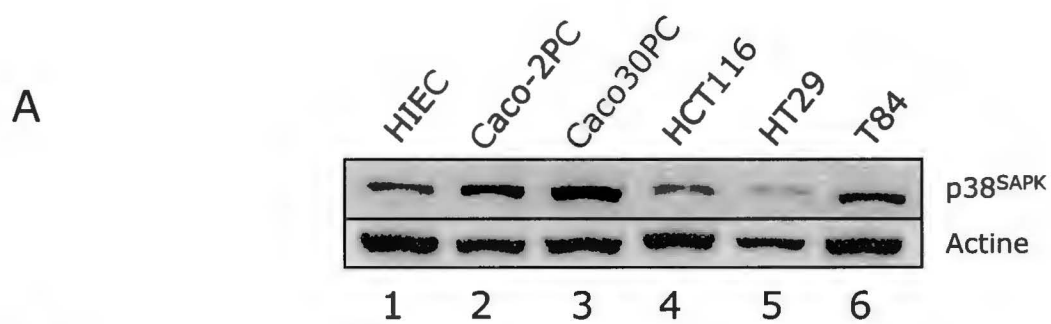


5. La kinase de stress p38 et la survie cellulaire

5.1 Niveaux d'expression et d'activation de base de p38 chez différentes lignées de cancer colorectal.

Dans un premier temps, nous avons analysé par Western Blot les niveaux d'expression et d'activation de base de la kinase de stress p38 chez différentes lignées de cancer colorectal, soient les cellules HCT116, HT29 et T84. Ceci a été fait dans le but de comparer ces niveaux avec ceux observés chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Tel que résumé à la figure 46, nous observons que : 1) les niveaux d'expression de base de p38 sont plus élevés chez les cellules différenciées que chez les cellules indifférenciées (figure 46A+B) ; 2) les niveaux d'activation de base de p38 sont plus élevés chez les cellules indifférenciées que chez les cellules différenciées (figure 46C+D) ; 3) les niveaux d'expression de p38 chez toutes nos lignées cancéreuses de côlon (cellules HCT116, HT29 et T84) ressemblent à ceux des cellules indifférenciées (figure 46A+B) ; 4) les niveaux d'activation de p38 chez les cellules T84 s'apparentent à ceux des cellules différenciées (figure 46C+D) ; et 5) les niveaux d'activation de p38 chez les cellules HCT116 et HT29 ressemblent à ceux des cellules indifférenciées (figure 46C+D). Ces observations indiquent que les niveaux d'expression et d'activation de base de p38 chez les cellules HCT116 et HT29 (ne se différencient/polarisent pas) correspondent à leur degré de dédifférenciation, puisque ces niveaux corrélerent avec ceux des cellules indifférenciées. Ces observations indiquent également que les niveaux d'activation, mais

Figure 46. Les niveaux d'activation de base de p38 chez les différentes lignées de cancer colorectal correspondent à leur degré de dédifférenciation. A : Analyse Western Blot représentative de l'expression de p38 chez les cellules HIEC (ligne 1), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (ligne 2) et différenciées (30PC) (ligne 3), et chez les 3 lignées cancéreuses de côlon ; les cellules HCT116 (ligne 4), HT29 (ligne 5) et T84 (ligne 6). Les protéines totales (50 μ g/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour la protéine p38. La détection de l'actine a aussi été analysée pour des raisons de normalisation. B : Niveaux relatifs d'expression de p38 chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'expression de p38 ont été déterminés par le ratio de p38/Actine. C : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p38 chez les différentes lignées utilisées en A. Les protéines totales ont été séparées comme représenté en A et ont été détectées avec des anticorps spécifiques de la forme active de p38 (pp38), phospho-Thr180/Tyr182, et de la protéine p38 (p38). D : Niveaux relatifs d'activation de p38 chez les différentes lignées utilisées en A. Les bandes ont été semi-quantifiées par densitométrie et les niveaux relatifs d'activation de p38 ont été déterminés par le ratio de pp38/p38. Les données représentent la moyenne \pm SEM pour au moins 3 ($n \geq 3$) cultures séparées et indépendantes pour chaque lignée cellulaire analysée. * Différence statistiquement significative ($p \leq 0.05$) en comparaison aux Caco-2/15 -2PC.



non les niveaux d'expression de base de Erk-1/Erk-2 chez les cellules T84 (se polarisent), correspondent à leur degré de dédifférenciation, puisque ces niveaux corrèlent avec ceux des cellules épithéliales intestinales différenciées.

5.2 Impact de l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal.

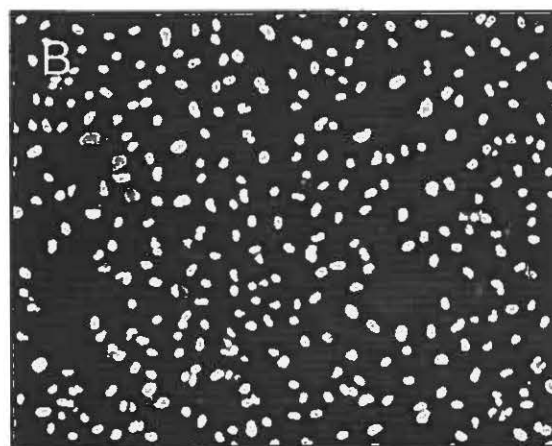
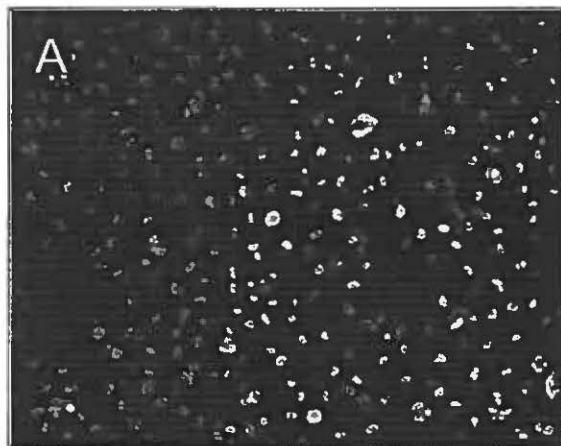
Nous avons vérifié l'impact de l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) par le SB202190 (20 μ M) sur la survie des différentes lignées de cancer colorectal utilisées (HCT116, HT29 et T84). À des fins de comparaison, cela a également été vérifié chez des cellules indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et des cellules différenciées (Caco-2/15 30PC). Un traitement à la génistéine (300 μ M) a aussi été utilisé comme contrôle positif d'apoptose. L'induction de l'apoptose a été visualisée par TUNEL *in situ*. Nous observons que : 1) l'absence de sérum n'induit pas l'apoptose chez la plupart de nos types cellulaires, excepté chez nos cellules T84 qui semblent être plus sensibles à l'absence de sérum (figures 47A+B, 48A+B, 49A+B, 50A+B, 51A+B, 52A+B) ; 2) le traitement à la génistéine, comme nous nous y attendions (Gauthier et al., 2001a), induit fortement l'apoptose chez tous les types cellulaires utilisés (figures 47C+D, 48C+D, 49C+D, 50C+D, 51C+D, 52C+D) ; 3) l'exposition au SB202190 n'induit pas l'apoptose tant chez les cellules indifférenciées que chez les cellules différenciées (figures 47E+F, 48E+F, 49E+F et 53), et comme nous nous y attendions (Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004) ; et 5) l'exposition au SB n'induit pas l'apoptose chez les lignées cancéreuses de côlon utilisées (figures 50E+F, 51E+F, 52E+F et 53). Ces résultats indiquent que les

Figure 47. Les cellules HIEC sont insensibles à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β). Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de SB202190 (+SB ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 10X.

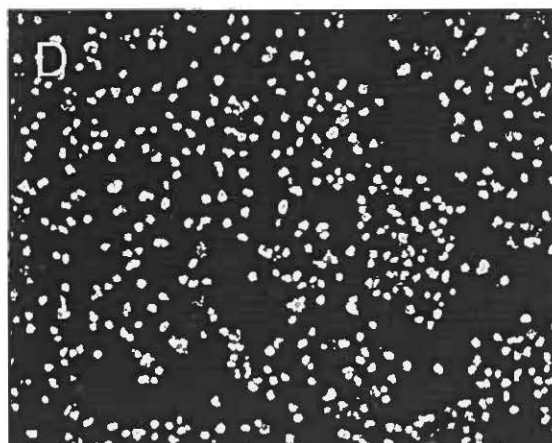
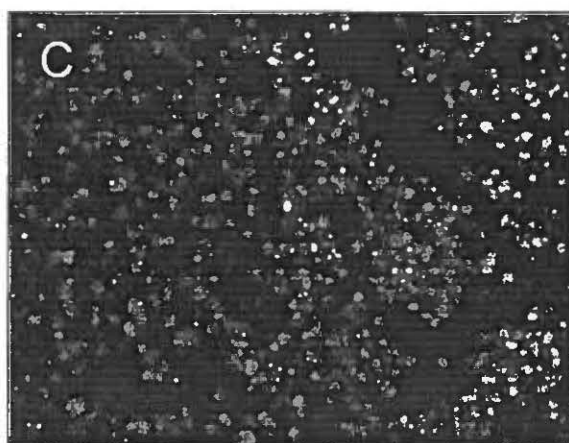
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+SB

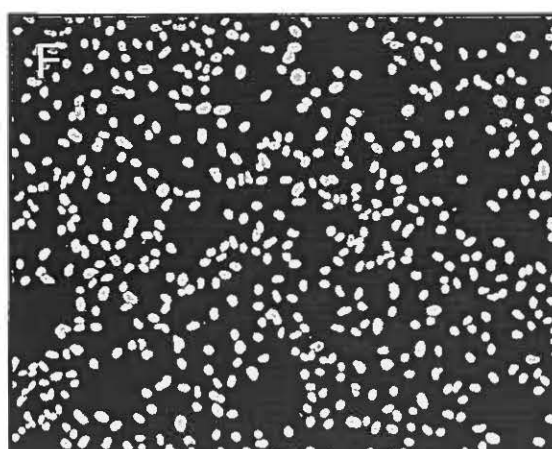
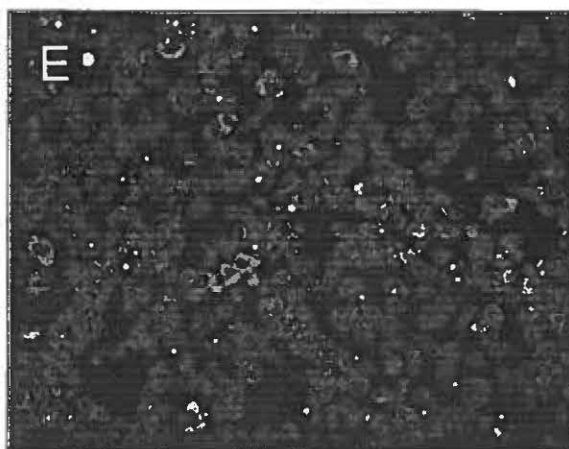
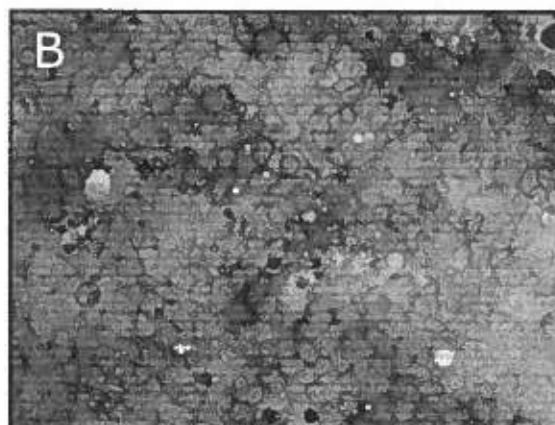
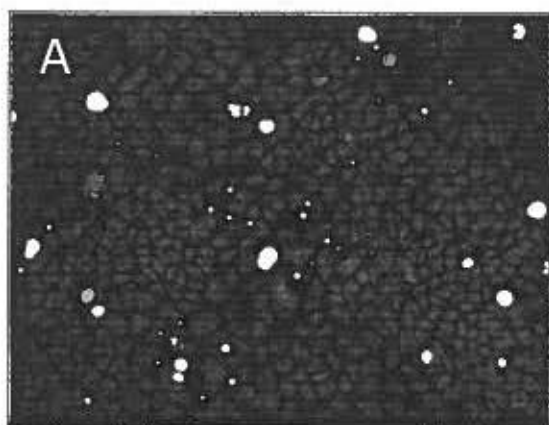


Figure 48. Les cellules Caco-2PC sont insensibles à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β). Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 -2PC (sous confluentes et indifférenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de SB202190 (+SB ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

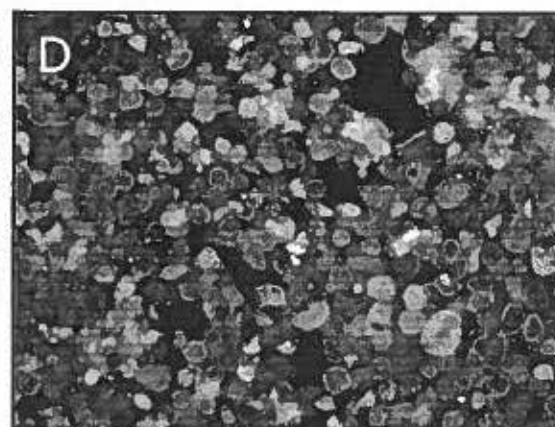
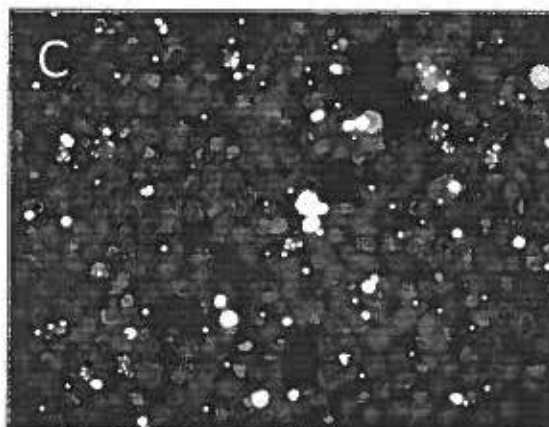
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+SB

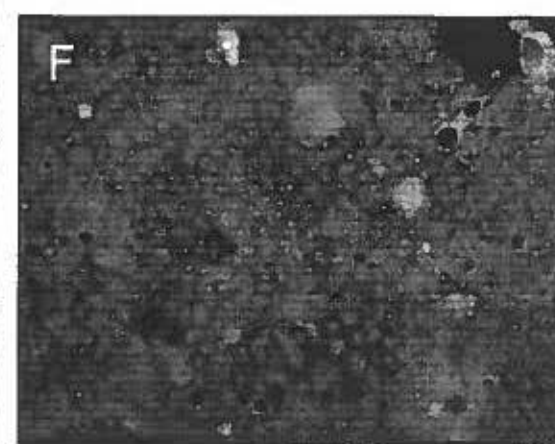
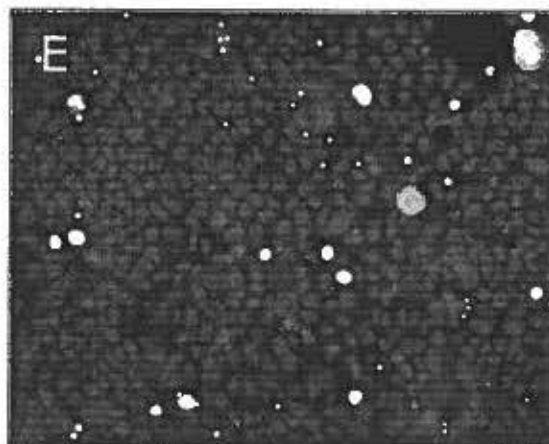
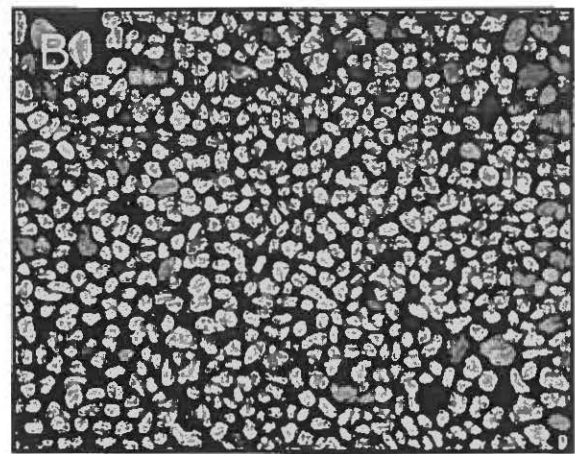
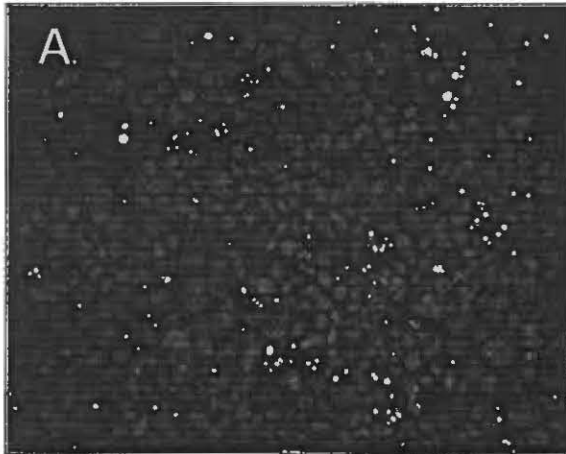


Figure 49. Les cellules Caco30PC sont sensibles à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β). Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules Caco-2/15 30PC (30 jours post-confluence et différenciées) qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de SB202190 (+SB ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

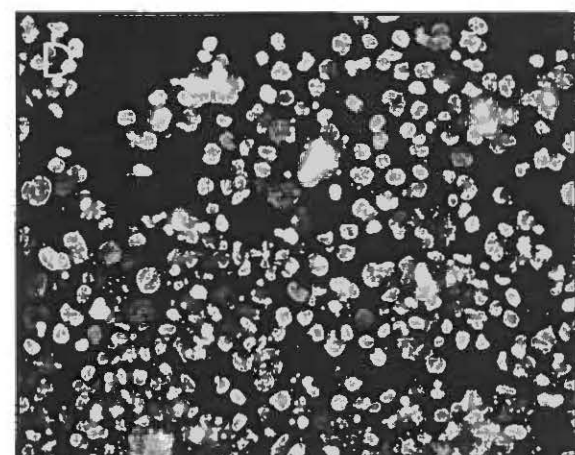
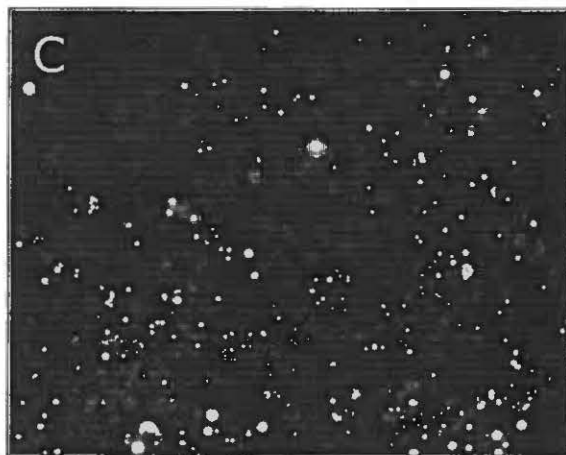
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+SB

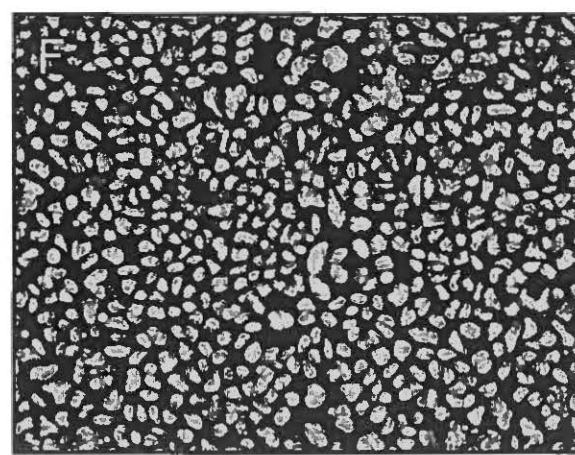
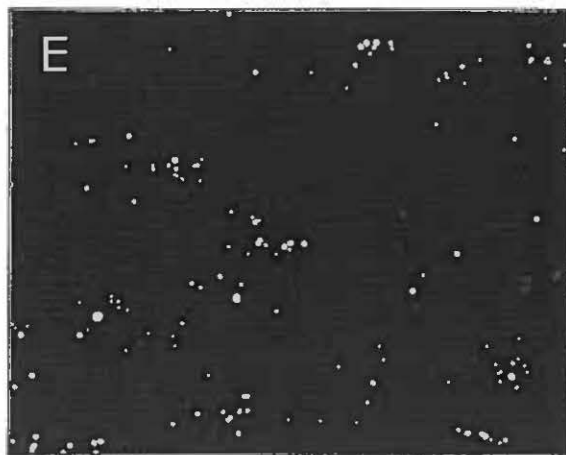
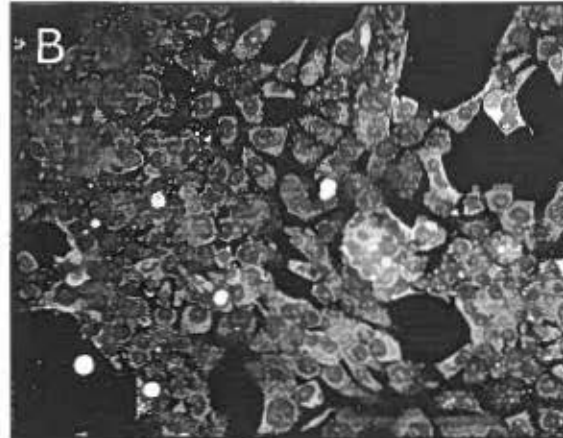
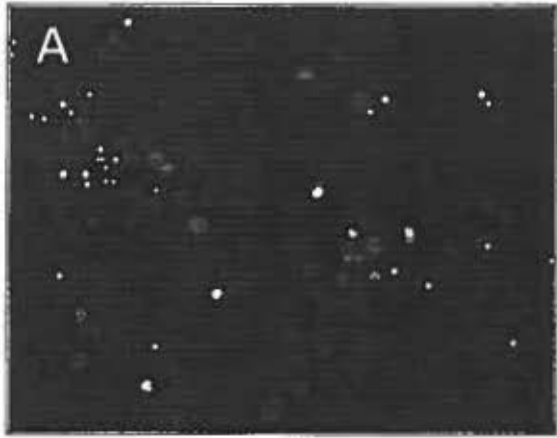


Figure 50. Les cellules HCT116 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β). Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HCT116 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de SB202190 (+SB ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

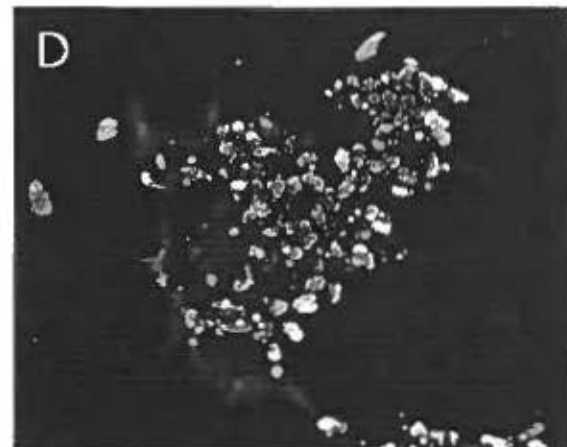
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+SB

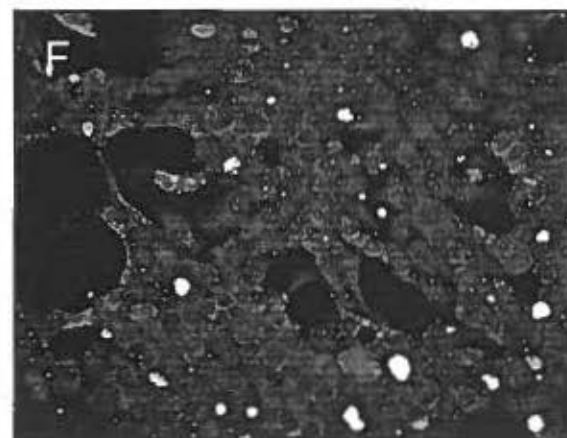
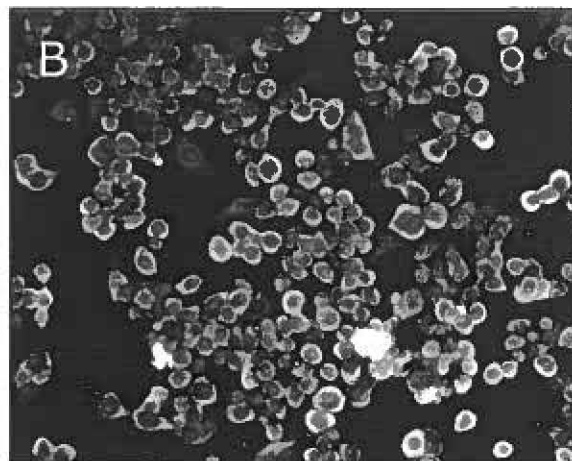
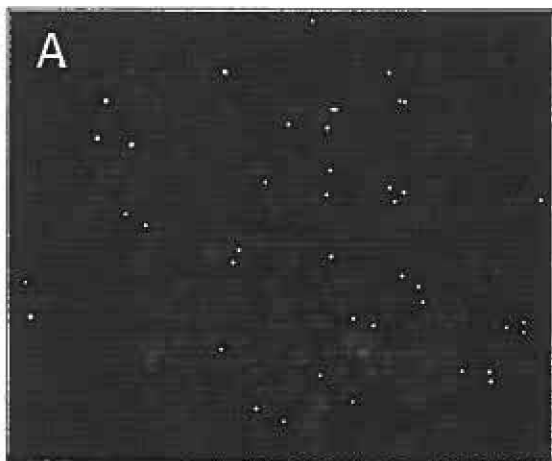


Figure 51. Les cellules HT29 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β). Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules HT29 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de SB202190 (+SB ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre RHD (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

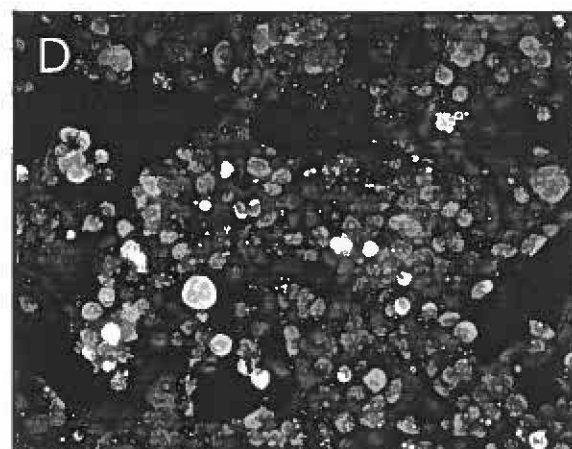
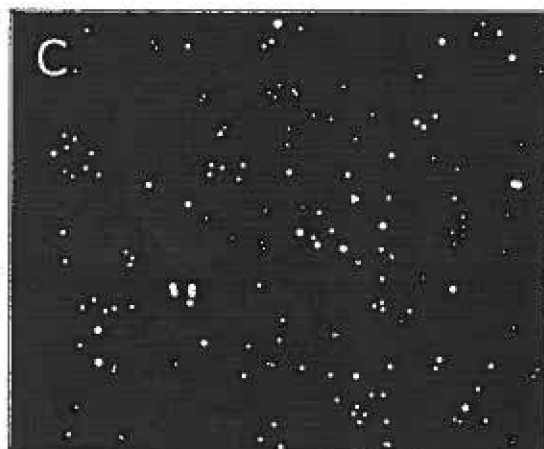
TUNEL *in situ*

Bleu d'Évans

Ctrl



+G



+SB

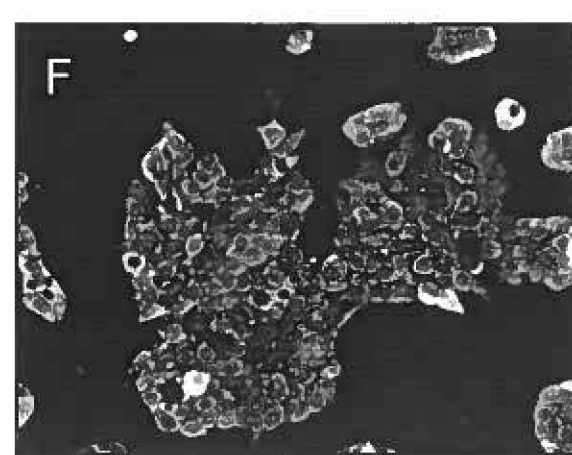
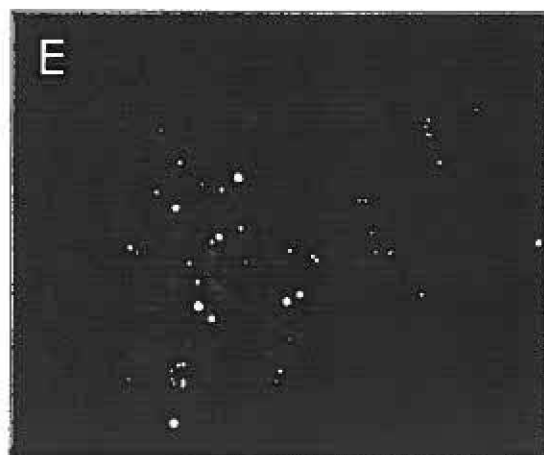
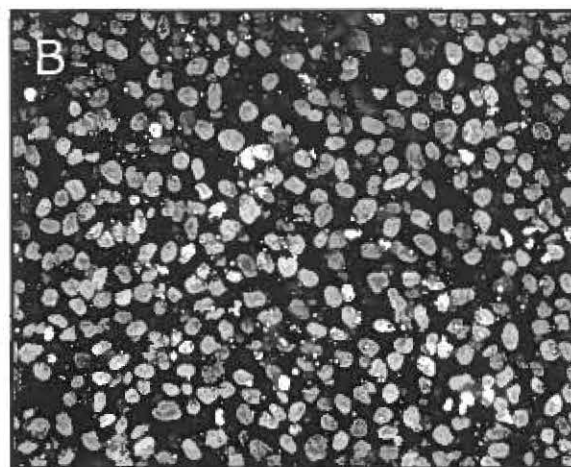
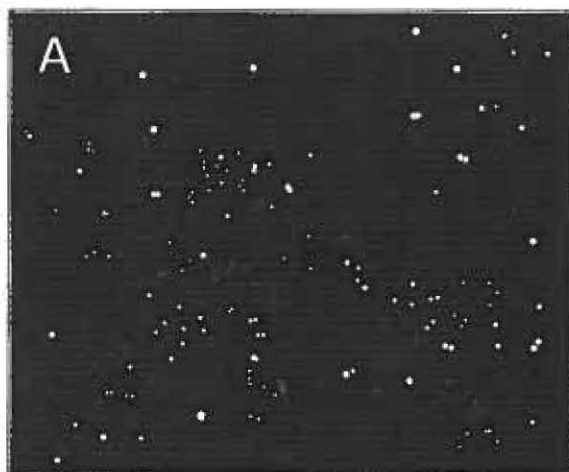


Figure 52. Les cellules T84 n'entrent pas en apoptose suite à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β). Micrographies représentatives de TUNELs *in situ* effectués chez les cellules T84 qui ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle ; A-B), ou en présence de 300 μ M de génistéine (+G ; C-D), ou en présence de 20 μ M de SB202190 (+SB ; E-F). La réaction TUNEL positive a été visualisée en utilisant un filtre FITC (A, C, E), alors que le marquage des cellules totales a été visualisé avec un filtre DAPI (B, D, F). A-F : Agrandissement original = 20X.

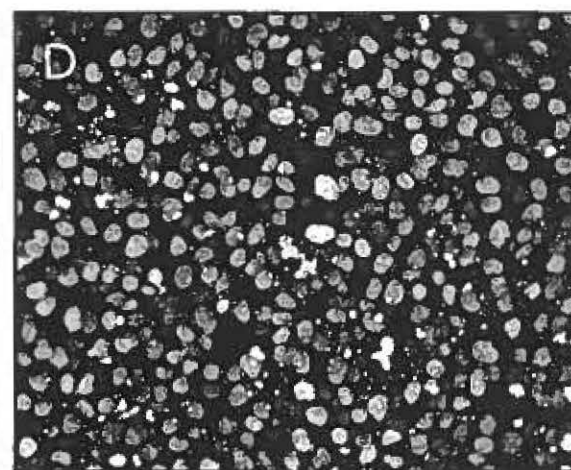
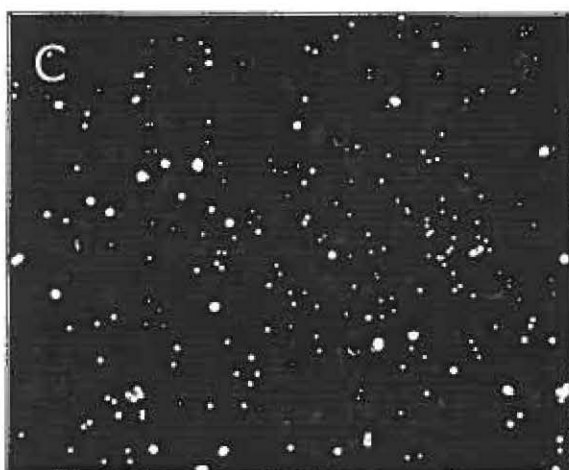
TUNEL *in situ*

DAPI

Ctrl



+G



+SB

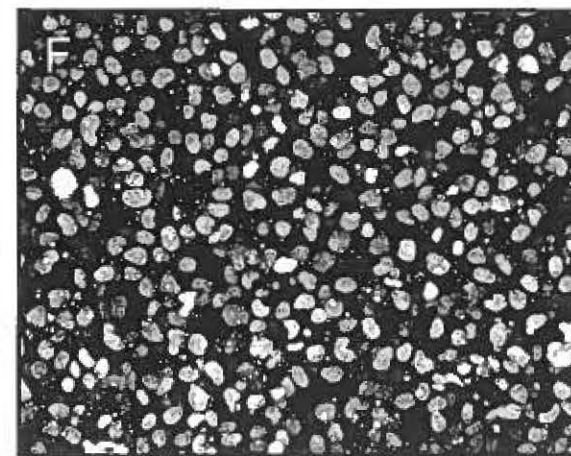
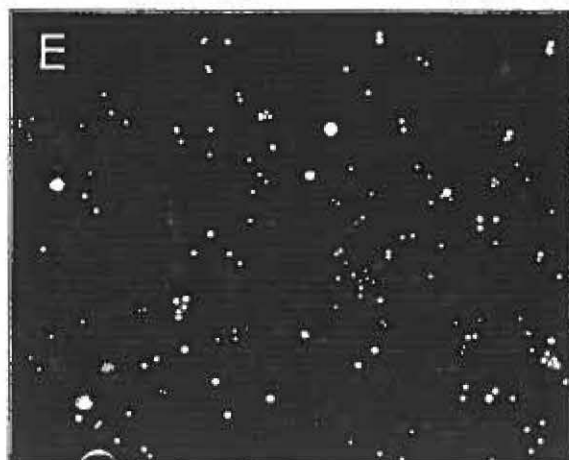
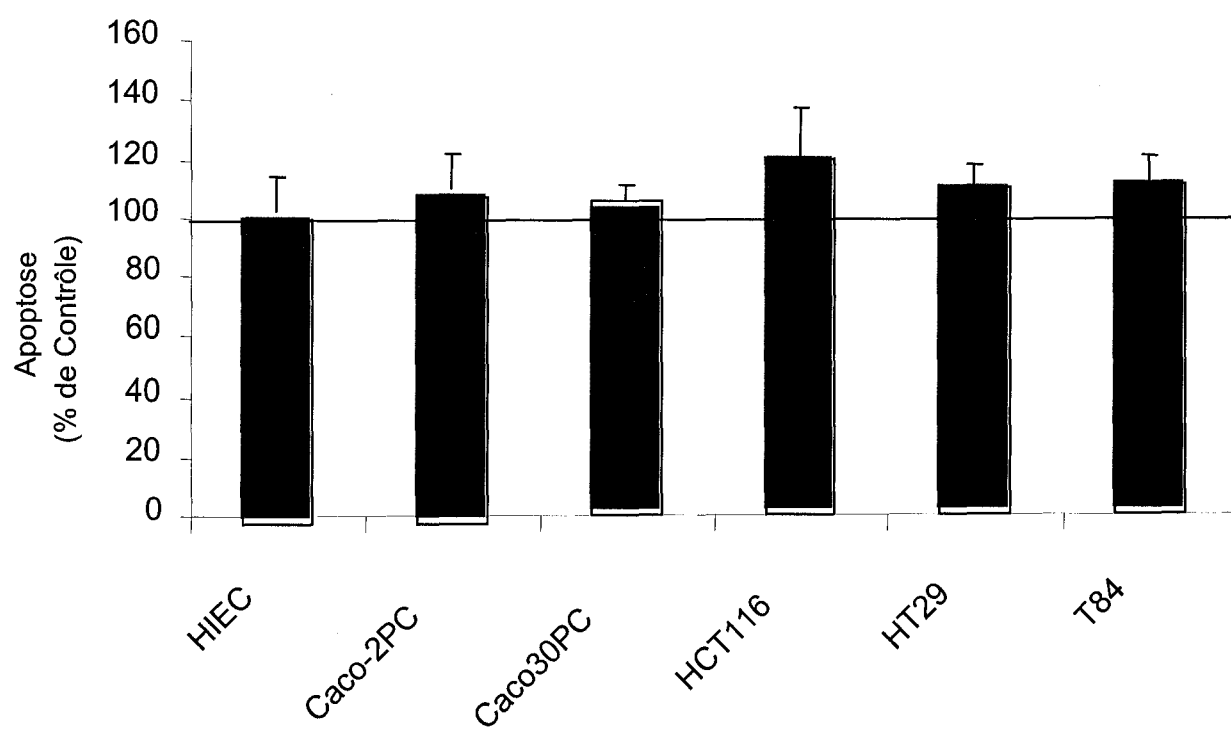


Figure 53. L'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) n'induit pas l'apoptose chez les cellules HCT116, HT29 et T84. Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) et différenciées (30PC) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84, ont été maintenues 48 heures dans un milieu sans sérum (contrôle) ou en présence de 20 μ M de SB202190 (SB), qui est un inhibiteur affectant spécifiquement l'activité catalytique des isoformes p38 α/β . Des TUNELs *in situ* ont été faits afin d'établir l'index relatif d'apoptose, s'exprimant comme le nombre de cellules apoptotiques pour le traitement SB par rapport au contrôle X100 (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules a été compté pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées.



cellules HCT116 et HT29 (qui ne se différencient pas) ainsi que les cellules T84 (qui se polarisent) sont insensibles à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) tout comme les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

Tableau 7. L'inhibition de l'activité catalytique de la kinase de stress p38 (α/β) n'induit pas l'apoptose chez les cellules HCT116, HT29 et T84.

Lignées Cellulaires	(a) Contrôle Sans Sérum (% de cellules apoptotiques)	Génistéine (300 μ M) (% de cellules apoptotiques)	SB202190 (20 μ M) (% de cellules apoptotiques)	(c) Index relatif (% de Contrôle)
HIEC	(b) 5.0 ± 2.5	18.4 ± 3.3	4.3 ± 1.6	86.0 ± 3.8
Caco-2PC	9.8 ± 1.8	31.3 ± 2.3	10.8 ± 1.5	109.1 ± 12.5
Caco30PC	13.0 ± 1.8	34.5 ± 5.6	13.9 ± 1.8	105.7 ± 4.9
HCT116	12.2 ± 2.1	46.0 ± 6.8	12.6 ± 2.0	119.6 ± 17.9
HT29	10.2 ± 1.2	21.0 ± 3.2	11.6 ± 1.6	109.3 ± 7.5
T84	20.6 ± 1.3	42.2 ± 3.1	22.7 ± 2.4	110.8 ± 9.9

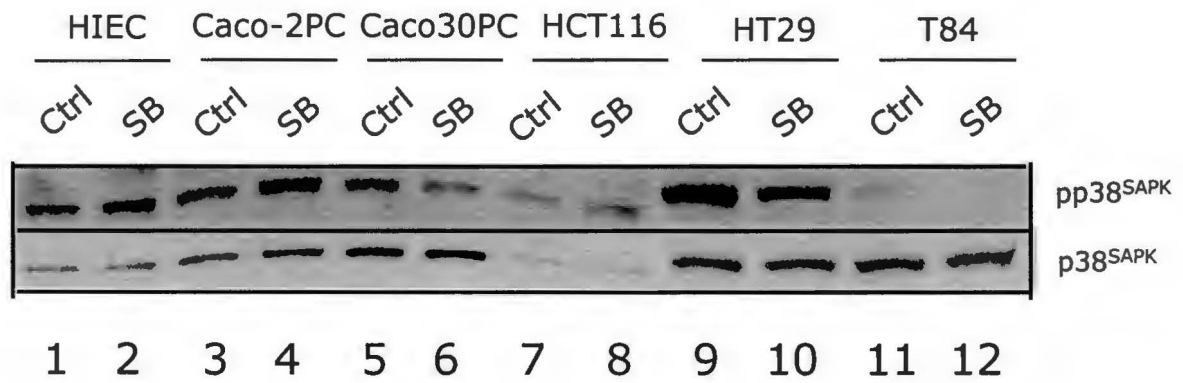
Les cellules HIEC (confluentes et indifférenciées), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (sous confluentes) et différenciées (30 jours post-confluence) et les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116, HT29 et T84 (a) ont été maintenues 48h dans un milieu DMEM sans sérum (contrôle), ou en présence de 300 μ M de génistéine, qui est un inhibiteur à large spectre des tyrosines kinases, ou en présence de 20 μ M de SB202190 (SB), qui est un inhibiteur de l'activité catalytique des isoformes p38(α/β). (b) Des TUNEL *in situ* ont été faits afin d'établir le pourcentage de cellules apoptotiques, s'exprimant comme étant le nombre de cellules apoptotiques sur le nombre de cellules totales comptées, obtenu pour chaque traitement. (c) L'index relatif a été établi, s'exprimant comme le pourcentage de cellules apoptotiques pour le traitement SB par rapport au contrôle (% de contrôle). Un minimum de 300 cellules ont été comptées pour au moins 3 ($n \geq 3$) expériences et/ou cultures séparées.

5.3 Effet de l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) sur les niveaux d'activation de p38 chez différentes lignées de cancer colorectal.

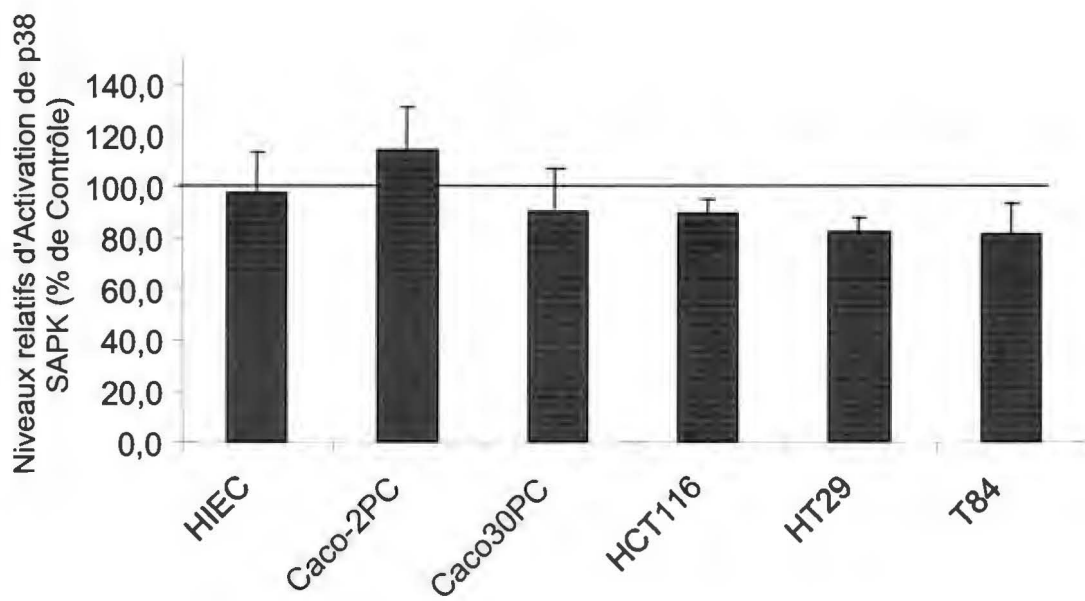
Nous avons vérifié l'efficacité de l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) par le SB (20 μ M) sur les niveaux d'activation de la kinase p38, chez les différentes lignées de cancer colorectal (HCT116, HT29 et T84), ainsi que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (HIEC et Caco-2/15 -2PC) et différenciées (Caco-2/15 30PC). Les niveaux relatifs d'activation de p38 ont été comparés à ceux des cultures contrôles (% de contrôle). Nos analyses indiquent que les niveaux relatifs d'activation de p38 demeurent inchangés suite à l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) et ce, chez toutes les lignées cellulaires analysées (figure 54A+B), confirmant ainsi que l'inhibition de l'activité catalytique peut ne pas se répercuter sur les niveaux d'activation (phosphorylation) d'une protéine.

Figure 54. L'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) n'induit aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase p38 chez les différentes lignées de cancer colorectal. A : Analyse Western Blot représentative de l'activation de p38 chez les cellules HIEC (lignes 1 et 2), les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) (lignes 3 et 4) et différenciées (30PC) (lignes 5 et 6) et chez les trois lignées cancéreuses de côlon, les cellules HCT116 (lignes 7 et 8), HT29 (lignes 9 et 10) et T84 (lignes 11 et 12), qui ont été maintenues 24 heures dans un milieu sans sérum (contrôle (ctrl) ; lignes 1, 3, 5, 7, 9 et 11) avec une addition de 20 μ M de SB202190 (SB ; lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12). Les cellules ont été lysées, et les protéines totales (50 μ g/puit) ont été séparées par SDS-PAGE sous des conditions réductrices, électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose et détectées avec un anticorps spécifique pour la forme active de p38 (WB : pThr180/pTyr182p38). La membrane a alors été détectée à nouveau avec l'anticorps détectant la protéine p38 (WB : p38). B : Même chose qu'en A. Les bandes immunoréactives ont été semi-quantifiées, et les niveaux relatifs d'activation de p38 ont été établis, lesquels en retour ont été comparés à ceux des cultures contrôles, X100 (exprimés en % de contrôle). Chaque valeur représente la moyenne \pm SEM pour chaque lignée cellulaire pour au moins 3 expériences et/ou cultures distinctes.

A



B



IV – DISCUSSION

Dans la présente étude, nous avons examiné la question à savoir si les cellules cancéreuses de côlon exhibent des attributs moléculaires de suppression de l'anoïkose qui s'apparentent plus aux cellules épithéliales intestinales indifférenciées que différenciées. Pour ce faire, nous avons utilisé trois lignées cancéreuses de côlon, soient les cellules HCT116, HT29 et T84, qui possèdent toutes des degrés de dédifférenciation distincts. Elles ont été comparées aux cellules cryptales normales indifférenciées (HIEC) et au modèle *in vitro* de différenciation entérocytaire, les cellules Caco-2/15 indifférenciées (-2PC) et différenciées (30PC). Nous avons donc analysé l'impact d'inhibiteurs de molécules et/ou de voies de signalisation sur la survie et sur les niveaux relatifs d'activation de protéines impliquées dans la signalisation de survie et/ou d'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales. Nous rapportons ce qui suit : (1) les cellules cancéreuses de côlon exhibent des susceptibilités à l'anoïkose distinctes de celles des cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées ; (2) les niveaux d'activation de base de FAK ne correspondent pas à celui des cellules indifférenciées ; (3) les niveaux d'activation de base d'Akt-1, de Erk-1/Erk-2 et p38 chez les cellules cancéreuses de côlon correspondent à celui des cellules indifférenciées ; (4) la survie des cellules HCT116 est dépendante de FAK et de la voie MEK/Erk, mais est indépendante de la PI3-K, ce qui ne correspond pas aux cellules indifférenciées ; (5) la survie des cellules HT29 est dépendante de FAK, de la voie MEK/Erk et de la PI3-K, ce qui ne correspond pas aux cellules indifférenciées ; (6) la survie des cellules T84 est dépendante de la voie MEK/Erk et de la PI3-K, mais est indépendante de FAK, ce qui ne correspond

pas aux cellules indifférenciées ; (7) les niveaux relatifs d'activation de p125^{FAK} diminuent significativement suite à la perte d'adhésion cellulaire et à l'inhibition spécifique de la kinase chez les cellules cancéreuses de côlon, et ce, tout comme chez les cellules indifférenciées et différenciées ; (8) les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 diminuent significativement suite à l'inhibition de la PI3-K ou suite à la perte d'adhésion cellulaire ou à l'inhibition de la kinase FAK chez les cellules cancéreuses de côlon, et ce, tout comme chez les cellules indifférenciées et différenciées ; (9) il semble y avoir coopération entre les voies PI3-K/Akt-1 et MEK/Erk pour la survie chez les cellules HCT116, ce qui ne correspond pas aux cellules indifférenciées ; (10) les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 diminuent significativement suite à l'inhibition de MEK et à l'inhibition de la kinase FAK chez les cellules cancéreuses, et ce, tout comme chez les cellules indifférenciées et différenciées ; et (11) la survie des cellules cancéreuses de côlon est indépendante de l'activité catalytique de p38 (α/β), tout comme les cellules indifférenciées et différenciées.

Mises ensemble, ces données indiquent que les cellules cancéreuses de côlon n'exhibent pas nécessairement des attributs moléculaires de suppression de l'anoïkose qui s'apparentent plus aux cellules épithéliales intestinales indifférenciées.

1. Les susceptibilités distinctes à l'anoïkose des cellules cancéreuses de côlon.

Il a été bien établi que les cellules doivent interagir avec les composantes de la matrice extracellulaire (MEC) afin d'assurer leur survie. Les signaux de survie engendrés via l'adhésion cellulaire sont médiés principalement via les intégrines. La perte de cette interaction entre la matrice et la cellule induit l'anoïkose chez plusieurs types cellulaires (Meredith et al., 1993 ; Frisch et Francis, 1994 ; Meredith et Schwartz, 1997). Les cellules épithéliales intestinales entrent également en anoïkose lorsqu'il y a perte d'adhésion cellulaire (Gauthier et al., 2001a ; Vachon et al., 2002 ; Dufour et al., 2004 ; Harnois et al., 2004). Nos résultats montrent qu'il y a établissement de profils distincts de susceptibilité à l'anoïkose (cinétique de 0 à 24 heures) entre les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées, supportant aussi le principe que les cellules épithéliales intestinales différenciées sont plus susceptibles à l'anoïkose que les cellules indifférenciées (Gauthier et al., 2001a ; Vachon et al., 2002 ; Dufour et al., 2004).

Les cellules cancéreuses sont la cible d'altérations génétiques qui conduisent la transformation progressive des cellules normales en cellules malignes (Foulds, 1954 ; Nowell, 1976 ; Evan et Littlewood, 1998 ; Hanahan et Weinberg, 2000). L'acquisition éventuelle de résistance à l'anoïkose, donc de survie adhésion indépendante, est une caractéristique que plusieurs lignées cancéreuses possèdent. Nos résultats montrent des susceptibilités distinctes à l'anoïkose chez les cellules cancéreuses de côlon analysées. Ainsi, les cellules HCT116 exhibent une sensibilité à l'anoïkose semblable à celle des cellules épithéliales intestinales indifférenciées ; les cellules HT29 semblent plus

résistantes à l'anoïkose que les cellules indifférenciées et différenciées, alors que la susceptibilité à l'anoïkose des cellules T84 s'apparente à celle des cellules différenciées.

De façon générale, ces résultats indiquent qu'il semble y avoir un lien entre le degré de dédifférenciation des cellules cancéreuses de côlon testées et leur susceptibilité à l'anoïkose. Par surcroît, les cellules cancéreuses incapables de se différencier en conditions normales de culture (HT29), exhibent même une résistance à l'anoïkose supérieure à celle des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, comme nous pouvions donc nous y attendre.

2. Implication différentielle de la kinase FAK dans la survie des cellules cancéreuses de côlon.

La kinase d'adhésion focalisée $p125^{FAK}$ joue un rôle central dans la médiation de signaux de survie via l'adhésion cellulaire (Frisch et al., 1996 ; Ilic et al., 1998 ; Giancotti et Ruoslahti, 1999 ; Schlaepfer et al., 1999). À cet effet, et tel que déjà rapporté (Lévy et al., 1998 ; Gauthier et al., 2001a ; Vachon et al., 2002 ; Dufour et al., 2004 ; Harnois et al., 2004), nos résultats montrent que les niveaux d'activation de FAK sont plus élevés chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées que chez les cellules différenciées, suggérant ainsi une implication différentielle de $p125^{FAK}$. À cet effet, l'inhibition de FAK induit l'anoïkose autant chez les cellules indifférenciées que différenciées, mais a beaucoup plus d'impact chez les cellules différenciées (Gauthier et al., 2001a).

Plusieurs études ont démontré une surexpression de FAK dans les cancers du côlon (Agochiya et al., 1999 ; Cance et al., 2000 ; Lark et al., 2003). Une étude en particulier démontre que les cellules cancéreuses de côlon HT29 présentent une amplification du nombre de copies du gène FAK (plus de 10 copies du gène comparativement à 2 normalement) qui serait associée à un niveau protéique élevé de p125^{FAK} (Agochiya et al., 1999). Nos résultats montrent que les niveaux d'activation de base de FAK chez les différentes lignées de cancer colorectal étudiées ici ne s'apparentent pas à ceux des cellules épithéliales intestinales indifférenciées. L'exception se retrouve chez les cellules cancéreuses T84 (qui se polarisent) où les niveaux d'activation de FAK sont semblables à ceux des cellules indifférenciées. Ainsi, les niveaux d'activation de FAK ne correspondent pas nécessairement au degré de dédifférenciation des différentes lignées cancéreuses analysées ici.

La kinase p125^{FAK} joue un rôle majeur dans la survie cellulaire (Frisch et al., 1996 ; Giancotti, 1997 ; Ilic et al., 1998). Dans notre laboratoire, il a été démontré que l'inhibition de FAK induit l'anoïkose chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées, ces dernières étant plus sensibles à l'inhibition de FAK (Gauthier et al., 2001a ; Vachon et al., 2004). Nos résultats montrent que l'inhibition de la kinase FAK par la cytochalasine D induit l'anoïkose chez les cellules HCT116 et HT29 avec des sensibilités similaires à celles des cellules indifférenciées. L'exception est retrouvée chez les cellules T84, qui n'entrent pas en anoïkose suite à l'inhibition de FAK. L'étude de Golubvskaya et al. en (2003) montre que les cellules HT29 n'entrent pas en anoïkose lors de l'inhibition de FAK par l'introduction d'une construction dominante-

négative ; elle soutient qu'une double inhibition des activations de FAK et Src est nécessaire pour induire l'apoptose chez ces cellules. Afin de compléter notre étude, il serait important de tester l'implication de FAK dans la survie des cellules HCT116 et HT29 en effectuant des transfections avec des constructions mutantes de p125^{FAK} (p45^{FRNK} et Y397F).

À cet effet, étant donné que l'inhibition de FAK par la cytochalasine D n'a pas d'effet sur la survie des cellules T84, des constructions mutantes de p125^{FAK} (p45^{FRNK} et Y397F) ont été effectivement utilisées afin de confirmer si la kinase joue un rôle ou non dans la survie des cellules T84. Nos résultats montrent que l'introduction de la forme dominante négative naturelle (p45^{FRNK}) ou de la forme kinase inactivable (Y397F) de FAK n'induit pas l'anoïkose chez les cellules T84. Ceci confirme donc que la survie des cellules T84 est FAK-indépendante. En effet, la survie des cellules T84 pourrait être médiée via Fyn, une protéine membre de la famille Src. Il a été démontré que les cellules T84 exprimaient la cavéoline-1, une protéine associée aux jonctions serrées (Nusrat et al., 2000) et à la sous-unité α des intégrines (Porter et Hogg, 1998). Fyn permettrait alors l'activation de la voie de signalisation de survie Shc/Ras/Erk via la protéine adaptatrice, cavéoline-1 (Wary et al., 1998). Il a également été démontré que la plupart des lignées cancéreuses de côlon n'expriment pas la cavéoline-1 et que sa réexpression chez ces lignées (ex : HT29 et DLD-1) diminuait leur potentiel tumorigénique (Bender et al., 2000).

L'adhésion cellulaire et la kinase FAK étant intimement reliées, les effets de leurs inhibitions sur les niveaux d'activation relatifs de FAK ont été analysés. Dans notre laboratoire, il a été démontré que l'inhibition de l'adhésion cellulaire (polyhema/suspension) ou de la kinase FAK induit une baisse significative des niveaux relatifs d'activation de FAK chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004 ; Dufour et al., 2004). Nos résultats montrent que l'inhibition de l'adhésion cellulaire ou de la kinase FAK induisent également une baisse significative des niveaux relatifs d'activation de FAK chez les lignées cancéreuses de côlon analysées. Une autre étude, sur les cellules cancéreuses de côlon SW620, a également démontré qu'une perte d'adhésion cellulaire induisait une baisse de l'activation de la kinase FAK chez ces cellules (Walsh et al., 2003). Donc, même si FAK est surexprimée et/ou suractivée, la kinase peut tout de même être régulée. Et conséquemment, FAK peut malgré tout s'avérer importante pour la survie, comme c'est le cas ici pour les cellules HCT116 et les cellules HT29. Par contre, dans un contexte de cancérogenèse, FAK peut s'avérer non importante pour la survie, comme dans le cas des cellules T84. Il se peut alors que d'autres éléments de signalisation en amont et en aval de FAK soient déréglés.

3. Implication de la voie de signalisation PI3-K/Akt-1 dans la survie des cellules cancéreuses de côlon.

La voie PI3-K/Akt-1 est une voie reconnue pour être impliquée dans la survie de plusieurs types cellulaires (Coffer et al., 1998 ; Datta et al., 1999 ; Vanhaesebroeck et

Alessi, 2000). Trois isoformes d'Akt ont été caractérisées jusqu'ici dans les cellules de mammifères, soit Akt-1 (PKB α), Akt-2 (PKB β) et Akt-3 (PKB γ). Les études concernant les patrons d'expression de ces isoformes ont révélé que Akt-1 et Akt-2 étaient ubiquitaires, alors que Akt-3 était retrouvé d'une manière prédominante dans le cerveau, le cœur et les reins (Coffer et al., 1998 ; Chan et al., 1999 ; Datta et al., 1999 ; Brazil et Hemmings, 2001 ; Testa et Bellacosa, 2001). Les patrons d'activation d'Akt-1 et d'Akt-2 ont été déterminés chez les cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation entérocytaire ; ces derniers révèlent que l'activation d'Akt-1 augmente avec le processus de différenciation alors que celle d'Akt-2 diminue (Dufour et al., 2004). Il a également été démontré que l'activation d'Akt-1 seule est requise pour la survie des cellules épithéliales intestinales (Dufour et al., 2004 ; Harnois et al., 2004).

Dans certaines études, une augmentation des niveaux de p85, suivie d'une augmentation de l'activité de la PI3-K, ainsi que des niveaux de phosphorylation de son effecteur Akt, ont été démontrés dans plusieurs cas de tumeurs colorectales (Phillips et al., 1998 ; Itoh et al., 2002). Nos résultats montrent que les niveaux d'activation de base d'Akt-1 chez les différentes lignées de cancer colorectal s'apparentent à ceux des cellules épithéliales intestinales indifférenciées. L'exception se retrouve chez les cellules cancéreuses T84 (qui se polarisent) où les niveaux d'activation d'Akt-1 sont semblables à ceux des cellules différenciées. Donc, les niveaux d'activation d'Akt-1 semblent correspondre au degré de dédifférenciation des différentes lignées cancéreuses analysées ici.

Dans une étude précédente, nous avons déjà démontré que la PI3-Kinase était impliquée dans la survie des cellules épithéliales intestinales tant indifférenciées que différenciées (Gauthier et al., 2001a ; Vachon et al., 2002 ; Harnois et al., 2004). Des mutations au niveau de la sous-unité p85 α ont également déjà été détectées chez des tumeurs colorectales provoquant un état constitutif actif de la PI3-K (Philp et al., 2001). Nos résultats montrent que la PI3-K est impliquée dans la survie des cellules HT29 et T84 tout comme chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées. L'exception est retrouvée chez les cellules HCT116 où leur survie semble indépendante de la PI3-K. L'explication possible à cette indépendance serait que l'effecteur Akt pourrait être activé directement par la protéine Src (Jiang et Qiu, 2003), donc d'une manière PI3-K indépendante.

L'inhibiteur pharmacologique LY294002 est un inhibiteur spécifique de la sous-unité catalytique (p110) de la PI3-Kinase (Vlahos et al., 1994). Utilisé à la concentration effective de 30 μ M, le LY294002 ne provoque aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase p125^{FAK}, ni des MAPK Erk-1/Erk-2, autant chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées que différenciées (Gauthier et al., 2001a ; Dufour et al., 2004 ; Harnois et al., 2004). Nos résultats démontrent la spécificité du traitement LY294002 puisqu'il n'a aucun effet sur les niveaux d'activation de la kinase p125^{FAK} qui se trouve en aval de sa cible. Nos résultats montrent également que cet inhibiteur n'a pas d'effet sur les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2, qui se trouve en parallèle de sa cible, chez les cellules HT29 et T84, tout comme chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Cependant, il est bien connu que les voies de signalisation PI3-K/Akt et

MEK/Erk peuvent agir ensemble dans le maintien de la survie cellulaire, pouvant ainsi communiquer et s'influencer mutuellement, une étant capable de compenser pour l'inhibition de l'autre (Datta et al., 1999 ; Cross et al., 2000 ; Danilkovitch et al., 2000). Nos résultats suggèrent un tel effet compensatoire entre les voies de signalisation PI3-K/Akt-1 et MEK/Erk chez les cellules HCT116. Ce phénomène a déjà été observé chez les cellules épithéliales intestinales différenciées. En effet, lors de l'inhibition de la PI3-K par le LY294002, une augmentation de l'activation de Erk-1/Erk-2 était observée ; par contre, cette augmentation se visualisait uniquement sur une courte période (5-180 minutes) pour finalement demeurer stable 72 heures durant (Laprise et al., 2004). De notre côté, l'effet compensatoire n'est pas transitoire, et cela dénote des niveaux de régulation plus subtils.

Dans l'étude de Gauthier et al. en (2001a), il a été démontré que la protéine p57^{Akt} n'était pas impliquée dans la survie des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, démontrant une implication différentielle de la voie PI3-K/Akt dans la survie entérocytaire. Ce résultat est quelque peu erroné puisqu'il ne tient pas compte des différentes isoformes d'Akt qui peuvent avoir des rôles distincts selon l'état de différenciation entérocytaire. Récemment, il a été démontré que Akt-1, mais non Akt-2 jouait un rôle déterminant dans la suppression de l'apoptose chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées (Dufour et al., 2004). De plus, il a également été démontré que l'inhibiteur LY294002 exerçait son effet uniquement sur les niveaux d'activation d'Akt-1, autant chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées que

différenciées, démontrant que l'activation d'Akt-2 est PI3-K indépendante (Dufour et al., 2004).

Il a déjà été prouvé chez plusieurs lignées de cancer colorectal que l'inhibition de la PI3-K par le LY provoque une inhibition remarquable de la prolifération, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose cellulaire, qui corrélient avec une diminution des niveaux de phosphorylation d'Akt (Semba et al., 2002 ; Wang et al., 2002). Nos résultats confirment ainsi que l'inhibition de la PI3-K constitue l'équivalent de l'inhibition de la voie de signalisation PI3-K/Akt-1 chez les différentes lignées cancéreuses de côlon analysées, et ce, tout comme chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

L'adhésion cellulaire ainsi que la kinase p125^{FAK} sont des composantes importantes dans la signalisation de survie puisqu'elles sont capables d'activer plusieurs voies de signalisation situées en aval, dont la voie PI3-K/Akt-1 (Chen et al., 1996). Cette relation au niveau de la survie est retrouvée chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées, puisque la perte d'adhésion cellulaire ou l'inhibition de la kinase FAK cause la chute des niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 (Vachon et al., 2002 ; Dufour et al., 2004 ; Harnois et al., 2004). Nos résultats montrent que l'effet de la perte d'adhésion cellulaire ou de l'inhibition de la kinase FAK se répercute sur les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 chez les cellules cancéreuses de côlon analysées, tout comme chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées. Par contre, les cellules T84 font exception puisque les niveaux relatifs d'activation d'Akt-1 semblent adhésion- et FAK-indépendants. L'explication possible à cette indépendance serait que Akt-1 pourrait être activée directement par la protéine Src (Jiang et Qiu, 2003).

4. Implication de la voie de signalisation MEK/Erk dans la survie des cellules cancéreuses de côlon.

La voie de signalisation MEK/Erk est responsable des processus de prolifération et de différenciation de plusieurs types cellulaires. Il a été montré que la voie MEK/Erk joue un double rôle chez les cellules épithéliales intestinales : la voie MEK/Erk est requise pour la prolifération des cellules indifférenciées, ainsi que pour le début du processus de différenciation entérocytaire (Aliaga et al., 1999). Les patrons d'activation de Erk-1/Erk-2 ont été déterminés chez les cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation entérocytaire ; ces derniers ont révélés que l'expression de Erk-1/Erk-2 augmentait avec le processus de différenciation alors que l'activation de Erk-1/Erk-2 diminuait (Aliaga et al., 1999 ; Gauthier et al., 2001a).

Plusieurs études sur le rôle central de la voie MEK/Erk dans les cancers du côlon ont été effectuées. Certaines de ces études ont été menées sur l'activation et l'activité des MAPK dans les tumeurs colorectales comparées aux tissus sains adjacents : ainsi, une étude démontre une augmentation d'activité des Erk (Licato et Brenner, 1998), une autre démontre une baisse d'activité des Erk (Wang et al., 2000b), alors qu'une autre étude démontre qu'il n'y avait aucun changement dans les niveaux d'activation des Erk (Miki et al., 1999). Une certaine confusion règne à ce niveau puisque ces études ont été menées *in vivo*, et il est connu que les tumeurs sont composées d'un amas hétérogène de cellules cancéreuses à divers stades de progression tumorale. L'utilisation de lignées homogènes de cancer du côlon *in vitro* pourrait clarifier la situation. Nos résultats montrent que les niveaux d'activation de base de Erk-1/Erk-2 chez les différentes lignées de cancer

colorectal s'apparentent à ceux des cellules épithéliales intestinales indifférenciées. L'exception se retrouve encore une fois chez les cellules cancéreuses T84 (qui se polarisent) où les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 sont semblables à ceux des cellules différenciées. Donc, les niveaux d'activation de Erk-1/Erk-2 correspondent bien au degré de dédifférenciation des différentes lignées cancéreuses de côlon analysées.

La voie de signalisation MEK/Erk est également une voie reconnue comme étant impliquée dans la survie de plusieurs types cellulaires (Xia et al., 1995 ; Gardner et Johnson, 1996 ; Kinoshita et al., 1997 ; LeGall et al., 2000). Chez les cellules épithéliales intestinales, la voie MEK/Erk joue un rôle mineur dans la survie des cellules différenciées alors qu'elle ne joue aucun rôle dans la survie des cellules indifférenciées (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004). Par contre, il a été démontré que l'inhibition de MEK par le PD98059 induit une baisse significative des niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées (Gauthier et al., 2001a ; Harnois et al., 2004).

Plusieurs évidences suggèrent que l'activation de la voie MAPK joue un rôle important dans la tumorigénèse (Lee et al., 2004). Dans les cancers colorectaux, la mutation du gène Ras est retrouvée avec une proportion de plus de 50% et augmente la phosphorylation des MAPK d'une manière significative (provoquant souvent l'activation constitutive active de la voie) chez plusieurs lignées cellulaires et cultures primaires dérivées de cancers du côlon (Kinzler et Vogelstein, 1996 ; Hoshino et al., 1999). Le gène suppresseur de tumeur p53 est aussi fréquemment muté dans approximativement

60% des cancers du côlon (Longley et al., 2002), et la perte de la fonction de p53 est responsable pour la progression des adénomes plus différenciés vers un phénotype plus agressif (Shivapurkar et al., 1997). Une étude a démontré pour la première fois chez des lignées cancéreuses de côlon qui possèdent une activation constitutive active des MAPK résultant de la mutation de Ras, que l'inhibition des MAPK amenait la mort cellulaire et que cet effet était strictement dépendant de p53. Donc, le statut de p53 détermine l'efficacité de l'inhibition pharmacologique de la voie des MAPK dans le cancer du côlon (Wang et al., 2004).

Nos résultats nous montrent que MEK est impliqué dans la survie des cellules cancéreuses de côlon analysées au contraire des cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Il est bien connu que les cellules HCT116 possèdent un gène Ras muté et une protéine p53 sauvage (Rajesh et al., 1999 ; Mueller et al., 2000 ; Han et al., 2002). Les cellules HT29 présentent une mutation de p53 ainsi qu'une protéine Ras non mutée (Rajesh et al., 1999 ; Magne et al., 2002 ; Barberi-Heyob et al., 2004), alors que les cellules T84 possèdent des protéines Ras et p53 sauvages (Stein, et al., 2000 ; Kiang et al., 2003). Analysant ces caractéristiques des lignées cancéreuses de côlon utilisées ici, nous pouvons confirmer le fait que l'inhibition de MEK provoque l'apoptose chez ces cellules.

L'inhibiteur pharmacologique PD98059 est un inhibiteur spécifique de MEK qui permet de prévenir l'activation de Erk (Dudley et al., 1995 ; Alessi et al., 1995 ; English et Cobb, 2002). Utilisé à la concentration effective de 20 μ M, le PD98059 ne provoque aucune modulation des niveaux d'activation de la kinase p125^{FAK}, ni de ceux d'Akt-1,

autant chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées que différenciées (Gauthier et al., 2001a ; Dufour et al., 2004 ; Harnois et al., 2004). Nos résultats démontrent la spécificité du traitement PD98059 puisqu'il n'a aucun effet sur les niveaux d'activation de la kinase p125^{FAK} qui se trouve en aval de sa cible, et ce chez les lignées cancéreuses de côlon analysées, tout comme chez les cellules indifférenciées et différenciées. Nos résultats montrent également que cet inhibiteur n'a pas d'effet sur les niveaux d'activation d'Akt-1, qui se trouve en parallèle de sa cible, chez les cellules cancéreuses de côlon, tout comme chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées.

De plus, nos résultats confirment que l'inhibition de MEK constitue l'équivalent de l'inhibition de la voie de signalisation MEK/Erk chez les différentes lignées cancéreuses de côlon analysées, et tout comme chez les cellules indifférenciées et différenciées.

La kinase p125^{FAK} est une composante importante dans la signalisation de survie puisqu'elle est capable d'activer plusieurs voies de signalisation situées en aval, dont la voie MEK/Erk (Frisch et Ruoslahti 1997). Cette relation au niveau de la survie est retrouvée chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées et différenciées, puisque l'inhibition de la kinase FAK cause la chute des niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 (Gauthier et al., 2001a; Harnois et al., 2004). Nos résultats montrent que l'effet de l'inhibition de la kinase FAK se répercute également sur les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2 chez les cellules cancéreuses de côlon, tout comme chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Cela démontre également que malgré la

présence d'une protéine Ras mutée, la kinase FAK peut toujours régulariser la voie des MAPK.

5. Implication de la kinase de stress p38 (α/β) dans la survie des cellules cancéreuses de côlon.

La MAPK de stress (SAPK, « stress-activated MAP Kinase »), aussi appelée p38, est une kinase pouvant être impliquée autant dans la survie cellulaire que dans l'apoptose/anoïkose (Frisch et Ruoslahti, 1997 ; Ichijo, 1999 ; Tibbles et Woodgett, 1999 ; Frisch et Screaton, 2001 ; Kyriakis et Avruch, 2001 ; Vachon et al., 2002) dépendamment du type cellulaire étudié (Ichijo, 1999 ; Krestow et al., 1999 ; Boucher et al., 2000 ; Noguchi et al., 2000 ; Kyriakis et Avruch, 2001 ; Laprise et al., 2002b). De plus, il est maintenant reconnu que les quatre isoformes identifiées de p38 (α , β , γ , δ) ont des rôles différents dépendamment du type cellulaire et de l'état de différenciation (Nemoto et al., 1998 ; Wang et al., 1998 ; Enslen et al., 2000 ; Kyriakis et Avruch, 2001 ; Laprise et al., 2002b ; Vachon et al., 2002). Le patron d'activation de p38 a été déterminé chez les cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation entérocytaire ; ce dernier a révélé que l'activation de p38 diminuait avec le processus de différenciation (Houde et al., 2001).

Quelques études ont également été menées sur l'activité de p38 dans les tumeurs colorectales comparées aux tissus sains adjacents : une étude montre une diminution de l'activité de p38 (Wang et al., 2000b), alors qu'une autre montre une augmentation de l'activité de p38 dans les tumeurs colorectales (Miki et al., 1999). Une certaine confusion

règne à ce niveau puisque ces études ont été menées *in vivo*, et il est connu que les tumeurs sont composées d'un amas hétérogène de cellules cancéreuses à divers stades de progression tumorale. L'utilisation de lignées homogènes de cancer du côlon *in vitro* pourrait clarifier la situation. Nos résultats montrent que les niveaux d'activation de base de p38 chez les différentes lignées de cancer colorectal s'apparentent à ceux des cellules épithéliales intestinales indifférenciées. L'exception se retrouve encore une fois chez les cellules cancéreuses T84 (qui se polarisent) où les niveaux d'activation de p38 sont semblables à ceux des cellules différenciées. Donc, les niveaux d'activation de p38 correspondent bien au degré de dédifférenciation des différentes lignées cancéreuses de côlon analysées.

Chez les cellules épithéliales intestinales, il a été démontré que les différentes isoformes de p38 sont impliquées ou non dans la survie des cellules épithéliales intestinales selon l'état de différenciation : l'isoforme p38 α est exprimée tant chez les cellules indifférenciées que différenciées et joue un rôle primordial au niveau du processus de différenciation entérocytaire (Houde et al., 2001), mais n'est pas impliquée dans la survie ou la mort cellulaire entérocytaire (Ding et al., 2001 ; Vachon et al., 2002) ; l'isoforme p38 β est exprimée exclusivement chez les cellules indifférenciées et est requise pour leur processus d'apoptose/anoïkose entérocytaire (Vachon et al., 2002) ; l'isoforme p38 γ est aussi exprimée chez les cellules épithéliales intestinales tant indifférenciés que différenciés, mais n'est pas impliquée dans la survie ou la mort cellulaire entérocytaire (Vachon et al., 2002) ; et finalement, l'isoforme p38 δ est

exprimée exclusivement chez les cellules épithéliales intestinales différenciés et elle est requise pour leur processus d'anoïkose entérocytaire (Vachon et al., 2002).

De plus, une étude prouve que l'activité de p38 est liée à la prolifération et à l'apoptose dans le cancer du côlon (Miki et al., 1999), alors qu'une autre étude reporte que l'activation constitutive de p38 n'était pas une caractéristique des tumeurs colorectales (Wang et al., 2000b). Nos résultats montrent que l'inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) par le SB202190 n'a aucun effet sur la survie des lignées cancéreuses de côlon analysées tout comme chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées.

Étant donné que le SB202190 est un inhibiteur spécifique de l'activité catalytique de p38 (α/β), il n'est pas surprenant de ne constater aucun changement dans les niveaux d'activation de p38 chez les cellules épithéliales intestinales tant indifférenciées que différenciées. Nos résultats montrent également qu'il n'y aucune modulation des niveaux d'activation de p38 chez les différentes lignées cancéreuses de côlon tout comme chez les cellules indifférenciées.

Cependant, il faut aussi considérer que le SB202190 provoque une modulation à la hausse de la voie des MAPK (Erk-1/Erk-2) chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (Harnois et al., 2004). Il faudrait alors s'assurer que le non effet du SB202190 sur la survie des cellules cancéreuses de côlon n'est pas dû à une hausse de l'activation de la voie MEK/Erk, qui est une voie importante pour leur survie (voir section 4). Dans un premier temps, il faudrait établir les profils d'expression des différentes isoformes de p38 chez les lignées cancéreuses de côlon utilisées. Par la suite,

une double inhibition de l'activité catalytique de p38 (α/β) et de la voie MEK/Erk devrait être effectuée, afin de vérifier l'effet de cette double inhibition sur la survie des cellules cancéreuses de côlon utilisées ici, ainsi que sur les niveaux relatifs d'activation de Erk-1/Erk-2. Finalement, il faudrait déterminer laquelle des isoformes de p38 est importante pour l'induction de l'anoïkose chez les cellules cancéreuses de côlon utilisées. Pour ce faire, il faudrait effectuer des transfections transitoires avec des constructions dominantes négatives des isoformes de p38 et vérifier le pourcentage d'apoptose résultant. Cela nous permettrait alors de déterminer si les isoformes de p38 responsables de l'induction de l'anoïkose chez les cellules cancéreuses de côlon sont les mêmes que chez les cellules épithéliales intestinales indifférenciées (p38 β) ou différenciées (p38 δ).

En résumé, la survie des cellules cancéreuses de côlon est gouvernée par des mécanismes qui peuvent s'avérer être distincts de ceux impliqués dans la survie des cellules épithéliales intestinales indifférenciées, que ce soit au niveau de leur susceptibilité à l'anoïkose ou de l'implication spécifique de molécules et/ou de voies de signalisation dans la survie des cellules épithéliales intestinales.

V – CONCLUSIONS

En conclusion, notre étude suggère que les cellules cancéreuses de côlon n'exhibent pas nécessairement des attributs moléculaires de suppression de l'anoïkose qui s'apparentent plus aux cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Jusqu'à aujourd'hui, la plupart des études sur le cancer du côlon étaient faites *in vivo*. Ces études sont souvent contradictoires puisque les échantillons de tumeurs prélevés contiennent un amas hétérogène de cellules à divers stades de progression tumorale. Nous pouvons également soupçonner que les échantillons cancéreux utilisés dans ces études n'étaient probablement pas purs, de part la présence persistante de cellules du tissu conjonctif environnant. De plus, la découverte de plusieurs isoformes de kinases impliquées dans la survie et/ou l'apoptose/anoïkose (ex : Akt et p38) ajoute un degré supplémentaire de complexité qu'il nous faut considérer. Afin de tenter de remédier à ces variables, nous avons utilisé plusieurs modèles *in vitro* de cellules cancéreuses de côlon (HCT116, HT29 et T84) qui possèdent toutes des degrés de dédifférenciation distincts. La présente étude ne nous a pas permis de confirmer une association potentielle entre les mécanismes de survie des cellules cancéreuses de côlon et ceux des cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Ceci est principalement dû au fait que chacune des lignées cancéreuses de côlon analysées possèdent des caractéristiques morphologiques, des degrés de dédifférenciation et des mécanismes de survie qui leur sont propres. D'autre part, il faut tenir compte que suite à leur isolement, les cellules cancéreuses ont été clonées afin de générer les lignées cellulaires relativement homogènes ; de plus, une lignée peut malgré tout contenir des sous-populations distinctes de cellules (ex : HCT116) (Brattain et al.,

1981 ; Chakrabarty et al., 1986 ; Boyd et al., 1988) . Nous ne pouvons donc pas d'une manière générale associer les cellules cancéreuses de côlon aux cellules épithéliales intestinales indifférenciées. Il va de soi qu'une étude plus approfondie des cellules cancéreuses de côlon devra être réalisée. D'une part, l'utilisation de lignées cancéreuses de côlon additionnelles (ex : SW, DLD-1, LoVo, Colo, etc.) pourrait apporter des précisions supplémentaires sur les propriétés de survie des cellules cancéreuses de côlon, ceci en se basant sur les caractéristiques morphologiques ainsi que le degré de dédifférenciation de ces nouvelles lignées, afin de les comparer à celles que nous avons utilisé dans notre étude. D'autre part, il serait intéressant d'analyser d'autres molécules impliquées dans la signalisation de survie et/ou de l'apoptose/anoïkose, comme Pyk-2, JNK, et les tyrosines kinases membres de la famille Src (ex : Src, Fyn et Yes). Plusieurs études futures, en addition des présents résultats, pourront procurer une meilleure compréhension des mécanismes complexes qui régissent la signalisation de survie et/ou d'apoptose/anoïkose chez les cellules cancéreuses de côlon, ainsi que leurs impacts sur la progression tumorale et l'avènement de métastases.

REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier le Dr. Pierre H. Vachon, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et permis de travailler sur un projet intéressant et stimulant. Un merci tout particulier à Anne Vézina pour ses précieux conseils techniques et merci d'avoir eu la patience de répondre à mes nombreuses questions. Je salue également ma partenaire de travail Véronique Bouchard, mais aussi mon amie, avec qui j'ai eu bien du fun ces deux dernières années. Merci aussi à Marie-Pier Tétreault et Geneviève Dufour pour leur belle amitié. J'exprime toute ma gratitude envers ma famille pour leur soutien et leur écoute depuis le tout début de mes études universitaires. Finalement, j'exprime tout mon amour à mon copain Brian qui depuis les 3 dernières années a toujours été à mon écoute et m'a toujours donné d'excellents conseils.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, J.M. et Cory, S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- Agochiya, M., Brunton, V.G., Owens, D.W., Parkinson, E.K., Paraskeva, C., Keith, W.N. et Frame, M.C. (1999) Increased dosage and amplification of the focal adhesion kinase gene in human cancer cells. *Oncogene* 18: 5646-5653.
- Agrez, M., Chen, A., Cone, R.I., Pytela, R. et Sheppard, D. (1994) The $\alpha\text{v}\beta 6$ integrin promotes proliferation of colon carcinoma cells through a unique region of the $\beta 6$ cytoplasmic domain. *J. Cell Biol.* 127: 547-556.
- Ahmed, N., Riley, C., Rice, G.E., Quinn, M.A. et Baker, M.S. (2002) $\alpha\text{v}\beta 6$ integrin-a marker for the malignant potential of epithelial ovarian cancer. *J. Histochem. Cytochem.* 50: 1371-1379.
- Albelda, S.M. et Buck, C.A. (1990) Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 4: 2868-2880.
- Albelda, S.M., Mente, S.A., Elder, D.E. et al. (1990) Integrin distribution in malignant melanoma : association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res.* 50: 6757-6764.
- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T. et Saltiel, A.R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 270: 27489-27494.
- Aliaga, J.C., Deschênes, C., Beaulieu, J-F., Calvo, E.L. et Rivard, N. (1999) Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 277: G631-G641.
- Allen, R.T., Hunter III, W.J. et Agrawal, D.K. (1997) Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J. Pharma. Toxicol. Meth.* 37: 215-228.
- Anderson, P. (1997) Kinase cascades regulating entry in apoptosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 33-46.
- Aplin, A.E., Howe, A., Alahari, S.K. et Juliano, R.L. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol. Rev.* 50: 197-263.

Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y. et Slamon, D.J. (2003) Overexpression of AKT2/Protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 63: 196-206.

Bachelder, R.E., Ribick, M.J., Marchetti, A. et al. (1999) p53 inhibits alpha 6 beta 4 integrin survival signaling by promoting the caspase 3-dependent cleavage of AKT/PKB. *J. Cell. Biol.* 147: 1063-1072.

Bachelder, R.E., Wendt, M.A., Fujita, N., Tsuruo, T. et Mercurio, A.M. (2001) The cleavage of Akt/PKB by death receptor signaling is an important event in detachment-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 276: 34702-34707.

Barberis, L., Wary, K.K., Fiucci, G., Liu, F., Hirsch, E., Brancaccio, M., Altruda, F., Tarone, G. et Giancotti, F.G. (2000) Distinct roles of the adaptor protein shc and focal adhesion kinase in integrin signalling to ERK. *J. Biol. Chem.* 275: 36532-36540.

Barberis-Heyob, M., Vedrine, P.O., Merlin, J.L., Millon, R., Abecassis, J., Poupon, M.F. et Guillemin, F. (2004) Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. *Int. J. Oncol.* 24: 951-958.

Beaulieu, J-F. (1999) Integrins and human intestinal cell functions. *Front. Biosci.* 4: 310-321.

Beaulieu, J-F. et Quaroni, A. (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma cells Caco-2. *J. Biochem.* 280: 599-608.

Bedi, A., Pasricha, P.J., Akhtar, A.J., Barber, J.P., Bedi, G.C., Giardiello, F.M., Zehnbauer, B.A., Hamilton, S.R. et Jones, R.J. (1995) Inhibition of apoptosis during development of colorectal cancer. *Cancer Res.* 55: 1811-1816.

Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A.K., Bell, D.W., Cheng, J.Q., Altomare, D.E., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G. et Masciullo, V. (1995) Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 64: 280-285.

Bender, F.C., Reymond, M.A., Bron, C. et Quest, A.F.G. (2000) Caveolin-1 levels are down-regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin-1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. *Cancer Res.* 60: 5870-5878.

Berra, E., Diaz-Meco, M.T. et Moscat, J. (1998) The activation of p38 and apoptosis by the inhibition of erk is antagonized by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* 273: 10792-10797.

- Biggs III, W.H., Meisenhelder, J., Hunter, T., Cavenee, W.K. et Arden, K.C. (1999) Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7421-7426.
- Boucher, M-J., Morisset, J., Vachon, P.H., Reed, J.C., Lainé, J. et Rivard, N. (2000) MEK/Erk signaling pathway regulates the expression of Bcl-2, Bcl-X_L, and Mcl-1 and promotes survival of human pancreatic cancer cells. *J. Cell. Biochem.* 79: 355-369.
- Bouck, N., Stellmach, V. et Hsu, S.C. (1996) How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* 69: 135-174.
- Boudreau, N., Simpson, C.J., Werb, Z. et Bissel, M.J. (1995) Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 267: 891-893.
- Boyd, D.D., Levine, A.E., Brattain, D.E., McKnight, M.K. et Brattain, M.G. (1988) Comparison of growth requirements of two human intratumoral colon carcinoma cell lines in monolayer and soft agarose. *Cancer Res.* 48: 2469-2474.
- Brattain, M.G., Fine, W.D., Khaled, M., Thompson, J. et Brattain, D.E. (1981) Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma. *Cancer Res.* 41: 1751-1756.
- Brazil, D.P. et Hemmings, B.A. (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *TRENDS Biochem. Sci.* 26: 657-664.
- Breitschopf, K., Haendeler, J., Malchow, P., Zeiher, A.M. et Dimmeler, S. (2000) Posttranslational modification of Bcl-2 facilitates its proteasome-dependent degradation: molecular characterization of the involved signalling pathway. *Mol. Cell Biol.* 20: 1886-1896.
- Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M. et al. (1994) Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 79: 1157-1164.
- Brooks, P.C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F.H. et Cheresch, D.A. (1995) Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J. Clin. Invest.* 96: 1815-1822.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J. et Greenberg, M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868.
- Budde, R.J., Ke, S.V. et Levin, V.A. (1994) Activity of pp60c-src in 60 different cell lines derived from human tumors. *Cancer Biochem. Biophys.* 14: 171-175.

Bulavin, D.V., Saito, S., Hollander, M.C., Anderson, C.W., Appella, E. et Fornace, A.J. (1999) Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinate N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation. *EMBO J.* 18: 6845-6854.

Burridge, M.F., Venot, V., Casara, P.J., Perron-Sierra, F., Hickman, J.A. et Tucker, G.C. (2003) Decrease in survival threshold of quiescent colon carcinoma cells in the presence of a small molecule integrin antagonist. *Mol. Pharmacol.* 63: 1281-1288.

Cance, W.G., Harris, J.E., Iacocca, M.V., Roche, E., Yang, X., Chang, J., Simkins, S. et Xu, L. (2000) Immunohistochemical analyses of focal adhesion kinase expression in benign and malignant human breast and colon tissues: correlation with preinvasive and invasive phenotypes. *Clin. Cancer Res.* 6: 2417-2423.

Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvasen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S. et Reed, J.C. (1998) Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282: 1318-1321.

Cary, L.A. et Guan, J-L. (1999) Focal adhesion kinase in integrin-mediated signaling. *Front. Biosci.* 4: d102-113.

Chakrabarty, S., Miller, C.A. et Brattain, M.G. (1986) Selective modifications of cellular proteins in intratumoral subpopulations of human colonic carcinoma cells. *Cancer Invest.* 4: 5-14.

Chan, T.O., Rittenhouse, S.E. et Tsichlis, P.N. (1999) Akt/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 68: 965-1014.

Chang, F., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R. et McCubrey, J.A. (2003) Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/Erk pathway. *Int. J. Oncol.* 22: 469-480.

Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M.G. et Zweibaum, A. (1988) Epithelial polarity, villin expression and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells : a survey of 20 cell lines. *Cancer Res.* 48: 1936-1942.

Chen, H-C., Appeddu, P.A., Isoda, H. et Guan, J-L. (1996) Phosphorylation of tyrosine 397 in focal adhesion kinase is required for binding phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 26329-26334.

Chen, R-H., Su, Y-H., Chuang, R.L.C. et Chang, T-Y. (1998) Suppression of transforming growth factor beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* 17: 1959-1968.

- Cheng, J.Q., Ruggeri, B., Klein, W.M., Sonoda, G., Altomare, D.E., Watson, D.K. et Testa, J.R. (1996) Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 3636-3641.
- Christofori, G. et Semb, H. (1999) The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem. Sci.* 24 :73-76.
- Clark, E.A. et Brugge, J.S. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268: 233-239.
- Clezardin, P. (1998) Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 54: 541-548.
- Coffer, P.J., Jin, J. et Woodgett, J.R. (1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem.* 335: 1-13.
- Coniglio, S.J., Jou, T.S. et Symons, M. (2001) Rac1 protects epithelial cells against anoikis. *J. Biol. Chem.* 276: 28113-28120.
- Coppolino, M.G. et Dedhar, S. (2000) Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32: 171-188.
- Cory, S. et Adams, M.J. (2002) The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev.* 2: 647-656.
- Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon E., Salmon M. et Lord J.M. (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp. Cell Res.* 256: 34-41.
- Crowder, R.J. et Freeman, R.S. (1998) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 18: 2933-2943.
- Daigo, Y., Furukawa, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Sugai, S., Nakamori, S., Liefers, G.J., Tollenaar, R.A.E.M., van de Velde, C.J.H. et Nakamura, Y. (1999) Absence of genetic alteration at codon 531 of the human c-src gene in 479 advanced colorectal cancers from Japanese and Caucasian patients. *Cancer Res.* 59: 4222-4224.
- Danilkovitch, A., Donley, S., Skeel, A. et Leonard, E.J. (2000) Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 20: 2218-2227.
- Datta, S.R., Brunet, A. et Greenberg, M.E. (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13 : 2905-2927.

- Datta, S.R., Katsov, A., Hu, L., Petros, A., Fesik, S.W., Yaffe, M.B. et Greenberg, M.E. (2000) 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate Bad by BH3 domain phosphorylation. *Mol. Cell* 6: 41-51.
- Del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R. et Nuñez, G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of Bad through the protein kinase Akt. *Science* 278: 687-689.
- DePinho, R.A. (2000) The age of cancer. *Nature* 408: 248-254.
- Deschesnes, R.G., Huot, J., Valerie, K. et Landry, J. (2001) Involvement of p38 in apoptosis-associated membrane blebbing and nuclear condensation. *Mol. Biol. Cell* 12: 1569-1582.
- Dharmasathaphorn, K., McRoberts, J.A., Mandel, K.G., Tisdale, D.L. et Masui, H. (1984) A human colonic tumor cell line that maintains vectorial electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 246: G204-G208.
- Dieckgraefe, B.K., Weems, D.M., Santoro, S.A. et Alpers, D.H. (1997) ERK and p38 MAP kinase pathways are mediators of intestinal epithelial wound-induced signal transduction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233: 389-394.
- Ding, Q., Wang, Q. et Evers, B.M. (2001) Alterations in MAPK activities associated with intestinal cell differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 284: 282-288.
- Dockrell, D.H., Badley, A.D., Villacian, J.S., Heppelmann, C.J., Algeciras, A., Ziesmer, S., Yagita, H., Lynch, D.H., Roches, P.C. et Leibson, P.J. (1998) The expression of Fas ligand by macrophages and its upregulation by human immunodeficiency virus infection. *J. Clin. Invest.* 101: 2394-2405.
- Downward, J. (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15 :177-82.
- Drucker, D.J. (1997) Epithelial cell growth and differentiation I. Intestinal growth factors. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 273: G3-G6.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.S., Kaplan, D.R. et Greenberg M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275: 661-665.
- Dudley, D.T., Pang, L., Decker, S.J., Bridges, A.J. et Saltiel, A.R. (1995) A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7686-7689.

- Dufour, G., Demers, M-J., Gagné, D., Dydesborg, A.B., Teller, I.C., Bouchard, V., Degongre, I., Beaulieu, J-F., Cheng, J.Q., Fujita, N., Tsuruo, T., Vallée, K. et Vachon, P.H. (2004) Human intestinal epithelial cell survival and anoikis : differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J. Biol. Chem.* 279: 44113-44122.
- Duxbury, M.S., Ito, H., Zinner, M.J., Ashley, S.W. et Whang, E.E. (2004) Focal adhesion kinase gene silencing promotes anoikis and suppresses metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells. *Surgery* 135: 555-562.
- Egan, C., Pang, A., Durda, D., Cheng, H-C., Wang, J.H. et Fujita, D.J. (1999) Activation of Src in human breast tumor cell lines: elevated levels of phosphotyrosine phosphatase activity that preferentially recognizes the Src carboxy terminal negative regulatory tyrosine 530. *Oncogene* 18: 1227-1237.
- Eide, M.D., Turck, C.N. et Escobedo, J.A. (1995) Identification of Tyr-397 as the primary site of tyrosine phosphorylation and pp60^{Src} association in the focal adhesion kinase, pp125^{FAK}. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2819-2827.
- Ellis, R.E., Yan, J.Y. et Horvitz, H.R. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663-698.
- English, J.M. et Cobb, M.H. (2002) Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 40-45.
- Enslen, H., Branchio, D.M. et Davis, R.J. (2000) Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *EMBO J.* 19: 1301-1311.
- Evan, G. et Littlewood, T. (1998) A matter of life and cell death. *Science* 281: 1317-1322.
- Fantini, J., Abadie, B., Tirard, A., Remy, L., Ripert, J.P., Battari, A.E.L. et Marvaldi, J. (1986) Spontaneous and induced dome formation by two clonal cell populations derived from a human adenocarcinoma cell line, HT29. *J. Cell Sci.* 83: 235-249.
- Faris, M., Kokot, N., Latinis, K., Kasibhatla, S., Green, D.R., Koretzky, G.A. et Nel, A. (1998) The c-Jun N-terminal kinase cascade plays a role in stress-induced apoptosis in Jurkat cells by up-regulating Fas Ligand expression. *J. Immunol.* 160: 134-144.
- Fearon, E.R. et Vogelstein, B.A. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-767.
- Fedi, P., Tronick, S.R. et Aaronson, S.A. (1997) Growth factors. In *Cancer Medicine* ; J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe et R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams et Wilkins), pp.41-64.

- Fogh, J., Fogh, J.M. et Orfeo, T. (1977) One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59: 221-226.
- Folkman, J. (1997) Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*. J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe et R.R. Weichselbaum. Eds. (Baltimore, MD: Williams et Wilkins), pp.181-204.
- Foulds, L. (1954) The experimental study of tumor progression. Volumes I-III. London: Academic Press.
- Frame, M.C. (2002) Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Bioch. Biophys. Acta* 1602: 114-130.
- Frisch, S.M. et Francis, H. (1994) Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124: 619-626.
- Frisch, S.M. et Ruoslahti, E. (1997) Integrins and anoikis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 701-706.
- Frisch, S.M. et Screaton, R.A. (2001) Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 555-562.
- Frisch, S.M., Vuory, K., Ruoslahti, E. et Chan-Gui, P.Y. (1996) Control of adhesion-dependent cell survival by focal adhesion kinase. *J. Cell Biol.* 134: 793-799.
- Fynan, T.M. et Reiss, M. (1993) Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit. Rev. Oncog.* 4 : 493-540.
- Gardner, A.M. et Johnson, G.L. (1996) Fibroblast growth factor-2 suppression of tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis requires Ras and the activation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271: 14560-14566.
- Gauthier, R., Harnois, C., Drolet, J-F., Reed, J.C., Vézina, A. et Vachon, P.H. (2001a) Human intestinal epithelial cell survival: differentiation state-specific control mechanisms. *Am. J. Physiol.* 280: C1540-C1554.
- Gauthier, R., Laprise, P., Cardin, É., Harnois, C., Plourde, A., Reed, J.C., Vézina, A. et Vachon, P.H. (2001b) Differential sensitivity to apoptosis between the human small and large intestinal mucosae : linkage with segment-specific regulation of Bcl-2 homologs and involvement of signalling pathways. *J. Cell. Biochem.* 82: 339-355.
- Gerber, H.P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B.A., Dixit, V. et Ferrara, N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 273 : 30336-30343.

- Giancotti, F.G. (1997) Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 691-700.
- Giancotti, F.G. et Ruoslahti, E. (1999) Integrin signaling. *Science* 285: 1028-1032.
- Goke, M., Kanai, M., Lynch-Devaney, K. et Podolsky, D.K. (1998) Rapid mitogen-activated protein kinase activation by transforming growth factor alpha in the wounded rat intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 114: 697-705.
- Golybovskaya, V.M., Gross, S., Kaur, A.S., Wilson, R.I., Xu, L-H., Yang, X.H. et Cancer, W.G. (2003) Simultaneous inhibition of focal adhesion kinase and Src enhances detachment and apoptosis in colon cancer cell lines. *Mol. Cancer Res.* 1: 755-764.
- Gonzalez-Amaro, R. et Sanchez-Madrid, F. (1999) Cell adhesion molecules : selectins and integrins. *Crit. Rev. Immunol.* 19: 389-429.
- Gordon, J.I. et Herminston, M.L. (1994) Differentiation and self-renewal in the mouse gastrointestinal epithelium. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 795-803.
- Green, D.R. (1998) Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94: 695-698.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, h., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., Sargeant, L., Krapcho, K., Wolff, E.E., Burt, R.W., Hugues, J.P., Warrington, J., McPherson, J., Wasmuth, J., LePaslier, D., Abderrahim, H., Cohen, D., Leppert, M. et White, R. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis gene. *Cell* 66: 589-600.
- Grossmann, J., Mohr, S., Lapetina, E.G., Fiocchi, C. et Levine, A.D. (1998) Sequential and rapid activation of select caspases during apoptosis of normal intestinal epithelial cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 274: G1117-G1124.
- Grossmann, J. (2002) Molecular mechanisms of detachment-induced apoptosis; anoikis. *Apoptosis* 7: 247-260.
- Guimarães, C.A. et Linden, R. (2004) Programmed cell death, apoptosis and alternative death styles. *Eur. J. Biochem.* 271: 1638-1650.
- Gumbiner, B.M. (1996) Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84: 345-357.
- Hague, A., Moorghen, M., Hicks, D., Chapman, M. et Paraskeva, C. (1994) Bcl-2 expression in human colorectal adenomas and carcinomas. *Oncogene* 9: 3367-3370.
- Hall, P.A. (1999) Assessing apoptosis: a critical survey. *Endocrine-related Cancer* 6: 3-8.

- Hall, P.A., Coates, P.J., Ansari, B. et Hopwood, D. (1994) Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J. Cell Sci.* 107: 3569-3577.
- Han, Z., Wei, W., Dunaway, S., Darnowski, J.W., Calabresi, P., Sedivy, J., Hendrickson, E.A., Balan, K.V., Pantazis, P. et Wyche, J.H. (2002) Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. *J. Biol. Chem.* 277: 17154-17160.
- Hanahan, D. et Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364.
- Hanahan, D. et Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Harnois, C., Demers, M-J., Bouchard, V., Vallée, K., Gagné, D., Fujita, N., Tsuruo, T., Vézina, A., Beaulieu, J-F., Côté, A. et Vachon, P.H. (2004) Human intestinal epithelial crypt cell survival and death : complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 198: 209-222.
- Harris, C.C. (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-and abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17: 1187-1198.
- Hayflick, L. (1997) Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry* 62: 1180-1190.
- Hirose, Y., Yoshimi, N., Suzuki, M., Kawabata, K., Tanaka, T. et Mori, H. (1997) Expression of Bcl-2, Bax and Bcl-X_L proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Mol. Carcinog.* 19: 25-30.
- Holmstrom, T.H., Chow, S.C., Elo, I., Coffey, E.T., Orrenius, S., Sistonen, L. et Eriksson, J.E. (1998) Suppression of FAS/APO-1 mediated apoptosis by mitogen-activated kinase signalling. *J. Immunol.* 160: 2626-2636.
- Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., Shimada, Y., Ari, I.S., Wada, H., Fujimoti, J. et Kohno, M. (1999) Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* 18: 813-822.
- Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C. et Rivard, N. (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J. Biol. Chem.* 276: 21885-21894.
- Humphries, M.J. (2000) Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* 28: 311-339.

- Hungerford, J.E., Compton, M.T., Matter, M.L., Hoffstrom, B.G. et Otey, C.A. (1996) Inhibition of pp125FAK in cultured fibroblasts results in apoptosis. *J. Cell Biol.* 135: 1383-1390.
- Hunter, T. (1997) Oncoprotein networks. *Cell* 88: 333-346.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R.G., Shah, G.M. et Landry, J. (1998) SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J. Cell Biol.* 143: 1361-1373.
- Hynes, R.O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69 :11-25.
- Ichijo, H. (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* 18: 6087-6093.
- Ilic, D., Almeida, E.A., Schlaepfer, D.D., Dazin, P., Aizawa, S. et Damsky, C.H. (1998) Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J. Cell. Biol.* 143: 547-560.
- Irby, R.B., Mao, W., Coppola, D., Jove, R., Gamero, A., Cuthbertson, D., Fujita, D.J. et Yeatman, T.J. (1997) Overexpression of normal c-Src in poorly metastatic human colon cancer cells enhances primary tumor growth but not metastatic potential. *Cell Growth Differ.* 8: 1287-1295.
- Irby, R.B., Mao, W., Coppola, D., Kang, J., Loubeau J-M., Trudeau, W., Karl, R., Fujita, D.J., Jove, R. et Yeatman, T.J. (1999) Activating Src mutation in a subset of advanced human colon cancers. *Nat. Genet.* 21: 187-190.
- Irby, R.B. et Yeatman, T.J. (2000) Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene* 19: 5636-5642.
- Itoh, N., Semba, S., Ito, M., Takeda, H., Kawata, S. et Yamakawa, M. (2002) Phosphorylation of Akt/PKB is required for suppression of cancer cell apoptosis and tumor progression in human colorectal carcinoma. *Cancer* 94: 3127-3134.
- Jacobson, M.D., Weil, M. et Raff, M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347-354.
- Jiang, T. et Qiu, Y. (2003) Interaction between Src and a C-terminal proline-rich motif of Akt is required for Akt activation. *J. Biol. Chem.* 278: 15789-15793.
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J. et Han, J. (1997) Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38 δ . *J. Biol. Chem.* 272: 30122-30128.

- Jimenez, C., Jones, D.R., Rodriguez-Viciana, P., Gonzalez-Garcia, A., Leonardo, E., Wennström, S., von Kobbe, C., Toran, J.L., R.-Borlado, L., Calvo, V., Copin, S.G., Albar, J.P., Gaspar, M.L., Diez, E., Marcos, M.A.R., Downward, J., Martinez-A., C., Merida, I. et Carrera, A.C. (1998) Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 17: 743-753.
- Jones, B.A. et Gores, G.J. (1997) Physiology and pathophysiology of apoptosis in epithelial cells of the liver, pancreas, and intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 273: G1174-G1188.
- Judson, P.L., He, X., Cance, W.G. et Van Le, L. (1999) Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer* 86: 1551-1556.
- Jumarie, C. et Malo, C. (1991) Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro. *J. Cell Physiol.* 149: 24-33.
- Kahana, O., Micksche, M., Witz, I.P. et Yron, I. (2002) The focal adhesion kinase (P125^{FAK}) is constitutively active in human malignant melanoma. *Oncogene* 21: 3969-3977.
- Kandel, E.S. et Hay, N. (1999) The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp. Cell Res.* 253: 210-229.
- Kennedy, S.G., Wagner, A.J., Conzen, S.D., Jordan, J., Bellacosa, A., Tsichlis, P.N. et Hay, N. (1997) The PI3-Kinase/Akt signalling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Gene & Dev.* 11: 701-713.
- Kerr, J.S., Wexler, R.S., Mousa, S.A. et al. (1999) Novel small molecule alpha v integrin antagonists: comparative anti-cancer efficacy with known angiogenesis inhibitors. *Anticancer Res.* 19: 959-968.
- Khwaja, A., Rodriguez-Vicana, P., Wennstom, S., Warne, P.H. et Downward, J. (1997) Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. *EMBO J.* 16: 2783-2793.
- Kiang, J.G., Warke, V.G. et Tsokos, G.C. (2003) NaCN-induced chemical hypoxia is associated with altered gene expression. *Mol. Cell. Biochem.* 254: 211-216.
- Kinoshita, T., Shirouzu, M., Kamiya, A., Hashimoto, K., Yokoyama, S. et Miyajima, A. (1997) Raf/MAPK and rapamycin-sensitive pathways mediate the anti-apoptotic functions of p21Ras in Il-3-dependent hematopoietic. *Oncogene* 15: 619-627.

Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Su, L.K., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hedge, P., McKechnie, D., Finniear, R., Markham, A., Groffen, J., Boguski, M., Altshul, S.F., Horii, A., Hiroshi, A., Miyoshi, Y., Miki, Y., Nishisho, L. et Nakamura, Y. (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253: 661-665.

Kinzler, K.W. et Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87: 159-170.

Koornstra, J.J., de Jong, S., Hollema, H., de Vries, E.G.E. et Kleibeuker, J.H. (2003) Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer : a systematic review of the literature. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 45: 37-53.

Krajewska, M., Moss, S.F., Krajewski, S., Song, K., Holt, P.R. et Reed, J.C. (1996) Elevated expression of Bcl-X and reduced Bak in primary colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res.* 56: 2422-2427.

Krestow, J.K., Rak, J., Filmus, J. et Kerbel, R.S. (1999) Functional dissociation of anoikis-like cell death and activity of stress-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260: 48-53.

Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssière, J-L. et Mignotte, B. (1995) The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 9: 1277-1287.

Kulik, G., Klippel, a. et Weber, M.J. (1997) Antiapoptotic signalling by the insulin-like growth factor 1 receptor phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt. *Mol. Cell. Biol.* 17: 1595-1606.

Kulik, G. et Weber, M.J. (1998) Akt-dependent and independent survival signalling pathways utilized by insulin-like growth factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6711-6718.

Kyriakis, J.M. et Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81 : 807-869.

Laghi, L., Bianchi, P., Orbetegli, O., Gennari, L., Roncalli, M. et Malesci, A. (2001) Lack of mutation at codon 531 of SRC in advanced colorectal cancers from italian patients. *British J. Cancer* 84: 196-198.

Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J-F., Boucher, M-J. et Rivard, N. (2002a) Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J. Biol. Chem.* 277: 8226-8234.

Laprise, P., Langlois, M-J., Boucher, M-J., Jobin, C. et Rivard, N. (2004) Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-Cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 199: 32-39.

- Laprise, P., Poirier, E.-M., Vézina, A., Rivard, N. et Vachon, P.H. (2002b) Merosin-integrin promotion of skeletal myofiber cell survival: differentiation state-distinct involvement of p60^{Fyn} tyrosine kinase and p38 α stress-activated MAP Kinase. *J. Cell. Physiol.* 191: 69-81.
- Laprise, P., Vallée, K., Demers, M.-J., Bouchard, V., Poirier, E.M., Vézina, A., Reed, J.C., Rivard, N. et Vachon, P.H. (2003) Merosin (laminin-2/4)-driven survival signaling: complex modulations of Bcl-2 homologs. *J. Cell. Biochem.* 89 :1115-1125.
- Lark, A.L., Livasy, C.A., Calvo, B., Caskey, L., Moore, D.T., Yang, X. et Cance, W.G. (2003) Overexpression of focal adhesion kinase in primary colorectal carcinomas and colorectal liver metastases: immunohistochemistry and real-time PCR analyses. *Clin. Cancer Res.* 9: 215-222.
- LeBlond, C.P. (1981) The life history of cells in renewing systems. *Am. J. Anat.* 160: 114-159.
- Lebrun, D.P., Wamke, R.A. et Cleary, M.L. (1993) Expression of Bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am. J. Pathol.* 142: 743-753.
- Lechner, C., Zahalka, M.A., Giot, J.F., Moller, N.P. et Ullrich, A. (1996) ERK6, a mitogen-activated protein kinase, is involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 4355-4359.
- Lee, J.W. et Juliano, R.L. (2000) $\alpha 5\beta 1$ integrin protects intestinal epithelial cells from apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B-dependent pathway. *Mol. Biol. Cell* 11: 1973-1987.
- Lee, S.H., Lee, J.W., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W., Park, W.S., Kim, S.H., Yoo, N.J. et Lee, J.Y. (2004) Colorectal tumors frequently express phosphorylated mitogen-activated protein kinase. *APMIS* 112: 233-238.
- Le Gall, M., Chambard, J.-C., Breitmayer, J.-P., Grall, D., Pouyssegur, J. et Obberghen-Schilling, E. (2000) The p42/p44 MAP Kinase pathway prevents apoptosis induced by anchorage and serum removal. *Mol. Biol. Cell* 11: 1103-1112.
- Le Gall, M., Chambard, J.-C., Grall, D. et Van Obberghen-Schilling, E. (2003) Adhesion-dependent control of Akt/protein kinase B occurs at multiple levels. *J. Cell. Physiol.* 196: 98-104.
- Le-Niculescu, H., Bonfonco, E., Kasuya, Y., Claret, F.X., Green, D.R. et Karin, M. (1999) Withdrawal of survival factors results in activation of the JNK pathways in neuronal cells leading to Fas Ligand induction and cell death. *Mol. Cell. Biol.* 19: 751-763.

- Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331.
- Levy, J.B., Iba, H. et Hanafusa, H. (1986) Activation of the transforming potential of p60^{c-src} by a single amino acid change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4228-4232.
- Lévy, P., Robin, H., Kornprobst, M., Capeau, J. et Cherqui, G. (1998) Enterocytic differentiation of the human caco-2 cell line correlates with alterations in integrin signaling. *J. Cell. Physiol.* 177: 618-627.
- Lévy, P., Robin, H., Bertrand, F., Kornprobst, M. et Capeau, J. (2003) Butyrate-treated colonic Caco-2 cells exhibit defective integrin-mediated signaling together with increased apoptosis and differentiation. *J. Cell. Physiol.* 197: 336-347.
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J. et Han, J. (1996) The primary structure of p38 γ : a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228: 334-340.
- Licato, L.L. et Brenner, D.A. (1998) Analysis of signaling protein kinases in human colon or colorectal carcinomas. *Digest. Diseases Sci.* 43: 1454-1464.
- Lin, P.H., Shenoy, S., Galitski, T. et Shalloway, D. (1995) Transformation of mouse cells by wild-type mouse c-Src. *Oncogene* 10: 401-405.
- Liotta, L.A. et Kohn, E. (2004) Cancer and the homeless cell. *Nature* 430: 973-974.
- Liu, W., Ahmad, S.A., Reinmuth, N. et al. (2000) Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature. *Apoptosis* 5: 323-328.
- Li-Weber, M., Laur, O., Hekele, A., Coy, J., Walczak, H. et Krammer, P.H. (1998) A regulatory element in the CD95 (APO-1/Fas) ligand promoter is essential for responsiveness to TCR-mediated activation. *Eur. J. Immunol.* 28: 2373-2383.
- Lizcano, J.M., Morrice, N. et Cohen, P. (2000) Regulation of Bad by cAMP-dependent protein kinase is mediated via phosphorylation of a novel site, Ser155. *Biochem. J.* 349: 547-557.
- Longley, D.B., McDermott, U. et Johnston, P.G. (2002) Clinical significance of prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* 2: 209-16.
- Loo, D.T. et Rillema, J.R. (1998) Measurement of cell death. *Meth. Cell Biol.* 57: 251-264.
- Luciano, F., Jacquelin, A., Colosetti, P., Herrant, M., Ganol, S., Pages, G. et Auberger, P. (2003) Phosphorylation of Bim-EL by Erk-1/2 on serine 69 promotes its degradation via the proteasome pathway and regulates its proapoptotic function. *Oncogene* 22: 6785-6793.

- Lukashev, M.E. et Werb, Z. (1998) ECM signaling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 8: 437-441.
- Lutz, M.P., Esser, I.B., Flossmann-Kast, B.B., Vogelmann, R., Luhrs, H., Friess, H., Buchler, M.W. et Adler, G. (1998) Overexpression and activation of the tyrosine kinase Src in human pancreatic carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243: 503-508.
- Madara, J.L., Stafford, J., Dharmasathaphorn, K. et Carlson, S. (1987) structural analysis of a human intestinal epithelial cell line. *Gastroenterology* 92: 1133-1145.
- Madara, J.L., Stafford, J., Barenberg, D. et Carlson, S. (1988) Functional coupling of tight junctions and microfilaments in T84 monolayers. *Am. J. Physiol.* 254: G416-G423.
- Maehama, T., Taylor, G.S. et Dixon, J.E. (2001) PTEN and myotubularin: novel phosphoinositide phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 70 : 247-279.
- Magne, N., Fischel, J.L., Dubreuil, A., Formento, P., Poupon, M.F., Laurent-Puig, P. et Milano, G. (2002) Influence of epidermal growth factor receptor (EGFR), p53 and intrinsic MAP kinase pathway status of tumor cells on the antiproliferative effect of ZD1839 ("Iressa"). *Br. J. Cancer* 86: 518-523.
- Marani, M., Hancock, D., Lopes, R., Tenev, T., Downward, J. et Lemoine, N.R. (2004) Role of Bim in the survival pathway induced by Raf in epithelial cells. *Oncogene* 23: 2431-2441.
- Markowitz, S., Wang, J., Myeroff, L., Parsons, R., Sun, L., Lutterbaugh, J., Fan, R.S., Zborowska, E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., et al. (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268 :1336-1338.
- Marshall, C.J., Franks, L.M. et Carbonell, A.W. (1977) Markers of neoplastic transformation in epithelial cell lines derived from human carcinomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 58: 1743-1751.
- McFall, A., Ulku, A., Lambert, Q.T., Kusa, A., Rogers-Graham, K. et Der, C.J. (2001) Oncogenic ras blocks anoikis by activation of a novel effector pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell Biol.* 21: 5488-5499.
- McGill, G., Shimamura, A., Bates, R.C., Savage, R.E. et Fisher, D.E. (1997) Loss of matrix adhesion triggers rapid transformation-selective apoptosis in fibroblasts. *J. Cell. Biol.* 138: 901-911.
- Medema, R.H. et Bos, J.L. (1993) The role of p21-ras in receptor tyrosine kinase signalling. *Crit. Rev. Oncog.* 4: 615-661.

- Ménard, D. et Beaulieu, J-F. (1994) Human intestinal brush border membrane hydrolases. In : Membrane physiopathology, Edited by Bkaily, G. Norwell: Kluwer Academic, p. 319-341.
- Meredith, J.E., Babak Fazeli, B. et Schwartz, M.A. (1993) The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol. Biol. Cell* 4: 953-961.
- Meredith, J.E. et Schwartz, M.A. (1997) Integrins, adhesion and apoptosis. *Cell Biol.* 7: 146-150.
- Mérida, I. et Carrera, A.C. (1998) Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase. *EMBO J.* 17: 743-753.
- Merritt, A.J., Potten, C.S., Watson, A.J.M., Yoh, D.Y., Nakayama, K. et Hickman, J.A. (1995) Differential expression of Bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J. Cell Sci.* 108: 2261-2271.
- Midgley, R. et Kerr, D. (1999) Colorectal cancer. *Lancet* 353: 391-399.
- Miki, H., Yamada, H. et Mitamura, K. (1999) Involvement of p38 MAP kinase in apoptotic and proliferative alteration in human colorectal cancers. *Anticancer Res.* 19: 5283-5292.
- Minett, T.W., Tighe, B.J., Lydon, M.J. et Rees, D.A. (1984) Requirements for cell spreading on polyHEMA coated culture substrates. *Cell. Biol. Int. Rep.* 8: 151-159.
- Mitjans, F., Meyer, T., Fittschen, C. et al. (2000) *In vivo* therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alpha v integrins. *Int. J. Cancer* 87: 716-723.
- Modrich, P. (1994) Mismatch repair, genetic instability and cancer. *Science* 266: 1959-1960.
- Moss, S.F. et Holt, P.R. (1996) Apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 111: 567-568.
- Moss, S.F., Scholes, J.V. et Holt, P.R. (1996) Abnormalities of epithelial apoptosis in multistep colorectal neoplasia demonstrated by terminal deoxyuridine nick end labelling. *Digest. Diseases Sci.* 41: 2238-2247.
- Mueller, S., Cadenas, E. et Schönthal, A.H. (2000) p21^{WAF1} regulates anchorage-independent growth of HCT116 colon carcinoma cells via E-cadherin expression. *Cancer Res.* 60: 156-163.
- Murakami, H. et Masui, H. (1980) Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3464-3468.

- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. et Shaw, A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signalling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84: 889-897.
- Muthuswamy, S.K. et Muller, W.J. (1994) Activation of the Src family of tyrosine kinases in mammary tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 64: 111-123.
- Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256: 12-18.
- Nelson, D.A. et White, E. (2004) Exploiting different ways to die. *Genes Dev.* 18 : 1223-1226.
- Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S. et Lin, A. (1998) Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38 β mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 273: 16415-16420.
- Neri, L.M., Borgatti, P., Capitani, S. et Marteli, A.M. (2002) The nuclear phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new second messenger system. *Bioch. Biophys. Acta* 1584: 73-80.
- Nicotera, P. et Melino, G. (2004) Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23: 2757-2765.
- Nikiforov, M.A., Hagen, K., Ossovskaya, V.S. et al. (1996) p53 modulation of anchorage independent growth and experimental metastasis. *Oncogene* 13: 1709-1719.
- Nikiforov, M.A., Kwek, S.S., Mehta, R. et al. (1997) Suppression of apoptosis by bcl-2 does not prevent p53-mediated control of experimental metastasis and anchorage dependence. *Oncogene* 15: 3007-3012.
- Noguchi, K., Yamana, H., Kitanaka, C., Mochizuki, T., Kokubu, A. et Kuchino, Y. (2000) Differential role of the JNK and p38 MAPK pathway in c-Myc- and s-Myc-mediated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 267: 221-227.
- Nowell, P.C. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28.
- Nusrat, A., Parkos, C.A., Verkade, P., Foley, C.S., Liang, T.W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K.K., Madara, J.L. (2000) Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 113: 1771-1781.
- O'Brien, V., Frisch, S.M. et Juliano, R.L. (1996) Expression of the integrin alpha 5 subunit in HT29 colon carcinoma cells suppresses apoptosis triggered by serum deprivation. *Exp. Cell. Res.* 224: 208-213.
- Okada, H. et Mak, T.W. (2004) Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. *Nature Rev.* 4: 592-603.

Oktay, M., Wary, K.K., Dans, M., Birge, R.B. et Giancotti, F.G. (1999) Integrin-mediated activation of focal adhesion kinase is required for signalling to Jun NH2-terminal kinase and progression through the G1 phase of the cell cycle. *J. Cell Biol.* 145: 1461-1469.

Pageot, L-P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P. et Beaulieu, J-F. (2000) Human cell models to study small intestinal functions : recapitulation of the crypt-villus axis. *Micros. Res. Tech.* 49: 394-406.

Pandey P., Avraham, S., Kumar, S., Nakazawa, A., Place, A., Granem, L., Rana, A., Kumar, V., Majumder, P.K., Avraham, H., Davis, R.J. et Kharbanda, S. (1999) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by PYK2/related adhesion focal tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 10140-10144.

Park, J. et Cartwright, C.A. (1995) Src activity increases and yes activity decreases during mitosis of human colon carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 15: 2374-2382.

Perreault, N. et Beaulieu, J-F. (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysine to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp. Cell Res.* 224: 354-364.

Perreault, N. et Beaulieu, J-F. (1998) Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 245: 34-42.

Peterson, G.L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry and al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* 83: 346-356.

Petruzzeli, L., Takami, M. et Humes, H.D. (1999) Structure and function of cell adhesion molecules. *Am. J. Med.* 106: 467-476.

Phillips, W.A., St.Clair, F., Munday, A.D., Thomas, R.J.S. et Mitchell, C.A. (1998) Increased levels of phosphatidylinositol 3-kinase activity in colorectal tumors. *Cancer* 83: 41-47.

Philp, A.J., Campbell, I.J., Leet, C., Vincan, E., Rockman, S.P., Whitehead, R.H., Thomas, R.J. et Phillips, W.A. (2001) The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res.* 61: 7426-7429.

Pinto, M., Robine-Léon, S., Appay, M.D., Keding, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. et Zweibaum, A. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47: 323-330.

Podolsky, D.K. (1993) Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers; many questions. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol.* 264: G179-G186.

- Polak-Charcon, S. et Ben-Shaul, Y. (1979) Degradation of tight junctions in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J. Cell Sci.* 35: 393-402.
- Porter, J.C. et Hogg, N. (1998) Integrins take partners : cross-talk between integrins and other membrane receptors. *Trends in Cell Biol.* 8: 390-396.
- Potten, C.S. (1992) The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev.* 11: 179-195.
- Potten, C.S. (1997) Epithelial cell growth and differentiation II. Intestinal Apoptosis. *Am. J. Physiol.* 273: G253-G257.
- Pritchard, D.M., Potten, C.S., Korsmeyer, S.J., Robert, S. et Hickman, J.A. (1999) Damage-induced apoptosis intestinal epithelia from Bcl-2-null and bax-null mice: investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. *Oncogene* 18: 7287-7293.
- Quaroni, A. et Beaulieu, J-F. (1997) Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 113: 1198-1213.
- Rajesh, D., Schell, K. et Verma, A.K. (1999) Ras mutation, irrespective of cell type and p53 status, determine a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A. *Mol. Pharmacol.* 56: 515-525.
- Re, F., Zanetti, A., Sironi, M. et al. (1994) Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J. Cell Biol.* 127: 537-546.
- Reed, J.C., Miyashita, T., Takayama, S., Wang, H.G., Sato, T., Krajewski, S., Aimé-Sempé, C., Bodrug, S., Kitada, S. et Hanada, M. (1996) Bcl-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J. Cell Biochem.* 60: 23-32.
- Renshaw, M.W., Price, L.S. et Schwartz, M.A. (1999) Focal adhesion kinase mediates the integrin signalling requirement for growth factor activation of MAP Kinase. *J. Cell Biol.* 147: 611-618.
- Renshaw, M.W., Ren, X-D. et Schwartz, M.A. (1997) Growth factor activation of MAP Kinase requires cell adhesion. *EMBO J.* 16: 5592-5599.
- Rhoades, K.J., Golub, S.H. et Economou, J.S. (1992) The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *J. Biol. Chem.* 267: 22102-22107.

- Rosen, N., Bolen, J.B., Schwartz, A.M., Cohen, P., DeSeau, V. et Israel, M.A. (1986) Analysis of pp60c-src protein kinase activity in human tumor cell lines and tissues. *J. Biol. Chem.* 261: 13754-13759.
- Rosen, K., Loza Coll, M., Li, A. et Filmus, J. (2001) Transforming growth factor- α prevents detachment-induced inhibition of c-Src kinase activity, Bcl-XL down-regulation and apoptosis of intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276: 37273-37279.
- Ruggeri, B.A., Huang, L., Wood, M., Cheng, J.Q. et Testa, J.R. (1998) Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol. Carcinog.* 21: 81-86.
- Ruoslahti E. (1996) Integrin signaling and matrix assembly. *Tumor Biol.* 17: 117-124.
- Ruoslahti, E. et Pierschbacher, M.D. (1987) New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238 : 491-7.
- Ruoslahti, E. et Reed, J.C. (1994) Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell* 77: 477-478.
- Rytomaa, M., Lehmann, K. et Downward, J. (2000) Matrix detachment induces caspase-dependent cytochrome c release from mitochondria: inhibition by PKB/Akt but not Raf signalling. *Oncogene* 19: 4461-4468.
- Saini, K.S et Walker, N.I. (1998) Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis. *Mol. Cell. Biochem.* 178: 9-25.
- Schaller, M.D., Hildebrand, J.D., Shannon, J.D., Fox, J.X., Vines, R.R. et Parsons, J.T. (1994) Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125^{FAK}, directs SH2-dependent binding of pp60^{Src}. *Mol. Cell. Biol.* 14: 1680-1688.
- Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T. et van der Geer, G.P. (1994) Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786-791.
- Schlaepfer, D.D. et Hunter, T. (1998) Integrin signalling and tyrosine phosphorylation : just the FAKs? *Cell Biol.* 8: 151-157.
- Schlaepfer, D.D., Jones, K.C. et Hunter, T. (1998) Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol. Cell. Biol.* 18: 2571-2585.
- Schneider, G.B., Kurago, Z., Zaharias, R., Gruman, L.M., Schaller, M.D. et Hendrix, M.J.C. (2002) Elevated focal adhesion kinase expression facilitates oral tumor cell invasion. *Cancer* 95: 2508-2515.

Schutte, M., Hruban, R., Hedrick, L., Cho, K., Nadasdy, G., Weinstein, C., Bova, G., Isaacs, W., Cairns, P. et Nawroz, H. (1996) DPC4 gene in various tumor types. *Cancer Res.* 56: 2527-2530.

Segal, R.A. et Greenberg, M.E. (1996) Intracellular signaling pathways activated by neurotrophic factors. *Annu. Rev. Neurosci.* 19: 463-489.

Semba, S., Itoh, N., Ito, M., Harada, M. et Yamakawa, M. (2002) The *in vitro* and *in vivo* effects of 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-chromone (LY294002), a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3'-kinase, in human colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* 8: 1957-1963.

Shaw, L.M., Rabinovitz, I., Wang, H.H., Toker, A. et Mercurio, A.M. (1997) Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. *Cell* 91: 949-960.

Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B. et Gray, J.W. (1999) PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nature Genet.* 21: 99-102.

Shivapurkar, N., Huang, L., Ruggeri, B., Swalsky, P.A., Bakker, A., Finkelstein, S., Frost, A. et Silverberg, S. (1997) K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett.* 115 : 39-46.

Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L.C., Kaplan, D.R. et Franke, T.F. (1997) Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11345-11350.

Sporn, M.B. (1996) The war on cancer. *Lancet* 347: 1377-1381.

Stein, J., Bauske, R. et Gerhard, R. (2000) Analysis of low-molecular-weight GTP-binding proteins in two functionally different intestinal epithelial cell lines. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915: 223-230.

Stupack, D.G. et Cheresch, D.A. (2002) Get a ligand, get a life: integrins, signalling and cell survival. *J. Cell Sci.* 115: 3729-3738.

Stutzmann, J., Bellissent-Waydelich, A., Fontao, L., Launay, J-F. et Simon-Assmann, P. (2000) Adhesion complexes implicated in intestinal epithelial cell-matrix interactions. *Microsc. Res. Tech.* 51: 179-190.

Sung, S.J., Walters, J.A., Hudson, J. et Gimble, J.M. (1991) Tumor necrosis factor-alpha mRNA accumulation in human myelomonocytic cell lines. Role of transcriptional regulation by DNA sequence motifs and mRNA stabilization. *J. Immunol.* 147: 2047-2054.

Takeshima, E., Hamaguchi, M., Watanabe, T., Akiyama, S., Kataoka, M., Ohnishi, Y., Xiao, H.Y., Nagai, Y. et Takagi, H. (1991) Aberrant elevation of tyrosine-specific phosphorylation in human gastric cancer cells. *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 1428-1435.

Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F. et Hynes, R.O. (1986) Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46 :271-282.

Tan, Y., Demeter, M.R., Ruan, H. et Comb, M.J. (2000) Bad ser-155 phosphorylation regulates Bad/Bcl-X_L interaction and cell survival. *J. Biol. Chem.* 275: 25865-25869.

Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M.R. et Comb, M.J. (1999) p90 (RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 274: 34859-34867.

Tanaka, A. et Fujita, D.J. (1986) Expression of a molecularly cloned human c-src oncogene by using a replication-competent retroviral vector. *Mol. Cell. Biol.* 6: 3900-3909.

Tanaka, A., Salem, M., Eckroade, R.J. et Fujita, D.J. (1990) Characterization of avian retroviruses carrying activated transforming human c-src genes and of steps involved in expression of activated src-PKases in vitro. *Oncogene Res.* 5:305-322.

Testa J.R. et Bellacosa A. (2001) Akt plays a central role in tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10983-10985.

Thompson, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267: 1456-1462.

Tibbles, L.A. et Woodgett, J.R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 1230-1254.

Townsend, P.A., Cutress, R.I., Sharp, A., Brimmel, M. et Packham, G. (2003) BAG-1: a multifunctional regulator of cell growth and survival. *Bioch. Biophys. Acta* 1603: 83-98.

Vachon, P.H. et Beaulieu, J-F. (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103: 414-423.

Vachon, P.H., Cardin, É., Harnois, C., Reed, J.C. et Vézina, A. (2000) Early establishment of epithelial apoptosis in the developing human small intestine. *Int. J. Dev. Biol.* 44: 891-898.

Vachon, P.H., Cardin, É., Harnois, C., Reed, J.C., Plourde, A. et Vézina, A. (2001) Early acquisition of bowel segment-specific Bcl-2 homolog expression profiles during development of the human ileum and colon. *Histol. Histopathol.* 16 : 497-510.

Vachon, P.H., Harnois, C., Grenier, A., Dufour, G., Bouchard, V., Han, J., Landry, J., Beaulieu, J-F., Vézina, A., Dydensborg, A.B., Gauthier, R., Côté, A., Drolet, J-F. et Lareau, F. (2002) Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* 123: 1980-1991.

Vachon, P.H., Loechel, F., Xu, H., Wewer, U.M. et Engvall, E. (1996a) Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J. Cell Biol.* 134: 1483-1497.

Vachon, P.H., Perreault, N., Magny, P. et Beaulieu, J-F. (1996b) Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *Cell Physiol.* 166: 198-207.

Valentini, A.M., Caruso, M.L., Armentano, R., Pirrelli, M., Rizzi, E., Lapenna, F. et Renna L. (1999) Programmed cell death in colorectal carcinogenesis. *Anticancer Res.* 19: 3019-3024.

Vanhaesebroeck, B. et Alessi, D.R. (2000) The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346: 561-576.

Varner, J.A., Brooks, P.C. et Cheresch, D.A. (1995) The integrin alpha v beta 3: angiogenesis and apoptosis. *Cell. Adhes. Commun.* 3: 367-374.

Varner, J.A. et Cheresch, D.A. (1996) Integrins and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 724-730.

Vaux, D.L. et Korsmeyer, S.J. (1999) Cell death in development. *Cell* 96: 245-254.

Verbeek, B.S., Vroom, T.M., Adriaansen-Slot, S.S., Ottenhoff-Kalff, A.E., Geertzema, J.G., Hennipman, A. et Rijksen, G. (1996) c-Src protein expression is increased in human breast cancer. An immunohistochemical and biochemical analysis. *J. Pathol.* 180: 383-388.

Viallard, V., Denis, C., Trocheris, V. et Murat, J.C. (1986) Effect of glutamine deprivation and glutamate or ammonium chloride addition on growth rate, metabolism and differentiation of human colon cancer cell line HT29. *Int. J. Biochem.* 18: 263-269.

Vivanco, I. et Sawyers, C.L. (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway in human cancer. *Nature Rev.* 2: 489-501.

Vlahos, C.J., Matter, W.F., Hui, K.Y. et Brown, R.F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269: 5241-5248.

Von Gise, A., Lorenz, P., Wellbrock, C., Hemmings, B., Berberich-Siebelt, F., Rapp, U.R. et Troppmair, J. (2001) Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK 1 requires MEK and phosphatidylinositol 3-kinase dependent signals. *Mol. Cell Biol.* 21: 2324-2336.

Walsh, M.F., Thamilselvan, V., Grotelueschen, R., Farhana, L. et Basson, M.D. (2003) Absence of adhesion triggers differential FAK and SAPKp38 signals in SW620 human colon cancer cells that may inhibit adhesiveness and lead to cell death. *Cell. Physiol. Biochem.* 13: 135-146.

Wang, N.M., Yeh, K.T., Tsai, C.H., Chen, S.J. et Chang, J.G. (2000a) No evidence of correlation between mutation at codon 531 of src and the risk of colon cancer in Chinese. *Cancer Lett.* 150: 201-204.

Wang Q., Ding, Q., Dong, Z., Ehlers, R.A. et Evers, B.M. (2000b) Downregulation of mitogen-activated protein kinases in human colon cancers. *Anticancer Res.* 20: 75-84.

Wang, Q., Li, N., Wang, X., Kim, M.M. et Evers, B.M. (2002) Augmentation of sodium butyrate-induced apoptosis by phosphatidylinositol 3'-kinase inhibition in the KM20 human colon cancer cell line. *Clin. Cancer Res.* 8: 1940-1947.

Wang, Y., Huang, S., Sah, V.P., Ross Jr., J., Brown, J.H., Han, J. et Chien, K.R. (1998) Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.* 273: 2161-2168.

Wang, Z., Li, Y., Liu, E.T. et Yu, Q. (2004) Susceptibility to cell death induced by blockade of MAPK pathway in human colorectal cancer cells carrying Ras mutations is dependent on p53 status. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322: 609-613.

Wary, K.K., Mariotti, A., Zurzolo, C. et Giancotti, F.G. (1998) A requirement for caveolin-1 and associated Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94: 625-634.

Weinberg, R.A. (1995) The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81: 323-330.

Weiner, J.A. et Chun, J. (1999) Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 5233-5238.

White, E. (1996) Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev.* 10: 1-15.

Wiener, J.R., Nakano, K., Kruzelock, R.P., Bucana, C.D., Bast Jr., R.C. et Gallick, G.E. (1999) Decreased Src tyrosine kinase activity inhibits malignant human ovarian cancer tumor growth in a nude mouse model. *Clin. Cancer Res.* 5: 2164-2170.

Wilson, J.W., Nostro, M.C., Balzi, M., Faraoni, P., Cianchi, F., Becciolini, A. et Potten, C.S. (2000) Bcl-w expression in colorectal adenocarcinoma. *Brit. J. Cancer* 82: 178-185.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. et Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270: 1326-1331.

Xu, L.H., Owens, L.V., Sturge, G.C., Yang, X., Liu, E.T., Craven, R.J. et Cance, W.G. (1996) Attenuation of the expression of the focal adhesion kinase induces apoptosis in tumor cells. *Cell Growth Differ.* 7: 413-418.

Yang, V.W. (2002) APC as a checkpoint gene: the beginning or the end? *Gastroenterology* 123: 935-939.

Yano, S., Tokumitsu, H. et Soderling, T.R. (1998) Calcium promotes cell survival through CaM-K Kinase activation on the protein-kinase B pathway. *Nature* 396: 584-587.

Yao, R. et Cooper, G.M. (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267: 2003-2006.

Yeh, J.H., Hsu, S.C., Han, S.H. et Lai, M.Z. (1998) Mitogen-activated protein kinase kinase antagonized Fas-associated death domain protein-mediated apoptosis by induced FLICE-inhibitory protein expression. *J. Exp. Med.* 188: 1795-1802.

Young, P.R., McLaughlin, M.M., Kumar, S., Kassis, S., Doyle, M.L., McNulty, D., Gallagher, T.F., Fisher, S., McDonnell, P.C., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Seibel, G., Porter, T.G., Livi, G.P., Adams, J.L. et Lee, J.C. (1997) Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* 272: 12116-12121.

Yu, C.F., Sanders, M.A. et Basson, M.D. (2000) Human Caco-2 motility redistributes FAK and paxillin and activates p38 MAPK in a matrix-dependent manner. *Am. J. Physiol.* 278: G952-G966.

Yuan, Z.Q., Sun, M., Feldman, R.I., Wang, G., Ma, X-L., Jiang, C., Coppola, D., Nicosia, S.V. et Cheng, J.Q. (2000) Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3-OH kinase/ Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene* 19: 2324-2330.

Zhang, Z., Vuori, K., Reed, J.C. et Ruoslahti, E. (1995) The $\alpha 5\beta 1$ integrin supports survival of cells on fibronectin and up regulates Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6161-6165.

Zhou, X.M., Liu, Y., Payne, G., Lutz, R.J. et Chittenden, T. (2000) Growth factors inactivate the cell death promoter Bad by phosphorylation of its BH3 domain on ser155. *J. Biol. Chem.* 275: 25046-25051.

Ziegler, U. et Groscurth, P. (2004) Morphological features of cell death. *News Physiol. Sci.* 19: 124-128.

Zweibaum, A. et Chantret, I. (1989) Human colon carcinoma cell lines as in vitro models for the study of intestinal cell differentiation. *Adaptation and development of gastrointestinal function*, M.W. Smith et F.V. Sepulveda Edition, Manchester University Press, Manchester, p.103-112.

Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E. et Louvard, D. (1989) The use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. Dans: *Handbook of Physiology, Intestinal transport of the gastrointestinal system*, ed. M. Field & R.A. Frizzell, American Physiological society.